

N° d'ordre 155-2013

Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

Ecole Doctorale Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 17 octobre 2013

par

Benjamin BONNEAU

TITRE :

**Implication des protéines de la famille Bcl-2 dans la régulation des flux
calciques au cours du développement embryonnaire précoce du poisson-
zèbre**

Directeur de thèse : Pr. Germain GILLET

JURY : Pr. Sophie VRIZ (rapporteur)
Dr. Marc MOREAU (rapporteur)
Pr. Jean-Claude MARTINOU (examineur)
Pr. Jan PARYS (examineur)
Pr. Germain GILLET (examineur)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme la Professeure H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

SOMMAIRE

AbrÉviations.....	10
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	13
1 La famille des protéines Bcl-2.....	14
1.1 Découverte	14
1.2 Classification et structure.....	15
1.2.1 Les protéines anti-apoptotiques multi-domaines	17
1.2.2 Les protéines pro-apoptotiques multi-domaines	18
1.2.3 Les protéines pro-apoptotiques à BH3-seulement	19
1.2.4 Structure des protéines Bcl-2.....	20
1.3 Implications des protéines Bcl-2 dans l'apoptose.....	21
1.3.1 L'apoptose	21
1.3.1.1 Généralités	21
1.3.1.2 Les caspases.....	22
1.3.1.2.1 Les caspases initiatrices	23
1.3.1.2.2 Les caspases effectrices.....	23
1.3.2 La voie extrinsèque de l'apoptose.....	24
1.3.3 La voie intrinsèque de l'apoptose	26
1.3.3.1 Principaux facteurs apoptogènes.....	26
1.3.3.1.1 Le cytochrome c.....	26
1.3.3.1.2 L'AIF	27
1.3.3.1.3 L'Endonucléase G	27
1.3.3.1.4 Les inhibiteurs des IAP.....	27
1.3.3.2 Voie dépendante de Bax et Bak	29
1.3.3.2.1 Activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak.....	29
1.3.3.2.1.1 Modèle d'activation directe.....	29
1.3.3.2.1.2 Le modèle d'activation indirecte	30
1.3.3.2.2 Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par Bax et Bak	31
1.3.3.2.2.1 Formation de canaux protéiques	32
1.3.3.2.2.2 Formation de pores lipidiques.....	32

1.3.3.3	Voie dépendante du calcium.....	33
1.3.3.3.1	<i>Ouverture du PTP.....</i>	33
1.3.3.3.2	<i>Induction de l'apoptose indépendamment du PTP.....</i>	36
1.4	Contrôle de l'homéostasie calcique par les Bcl-2	36
1.4.1	Au niveau du RE	36
1.4.1.1	Régulation par les membres anti-apoptotiques	37
1.4.1.2	Régulation par les membres pro-apoptotiques.....	39
1.4.2	Au niveau mitochondrial.....	41
1.5	Régulation des protéines Bcl-2 par phosphorylation.....	43
1.5.1	Régulation des protéines anti-apoptotiques.....	44
1.5.2	Régulation des protéines pro-apoptotiques	45
1.6	Implications des protéines Bcl-2 dans le développement et la vie adulte :	
	contribution de la génétique chez la souris	47
1.6.1	Membres anti-apoptotiques	47
1.6.2	Membres pro-apoptotiques	48
1.7	Rôle non-apoptotiques des protéines de la famille Bcl-2	48
1.7.1	Métabolisme.....	49
1.7.2	Dynamique mitochondriale.....	50
1.7.3	Cycle cellulaire	51
1.7.4	Plasticité neuronale.....	52
1.7.5	Activation des lymphocytes	53
1.7.6	Migration et invasion cellulaire	54
2	Le récepteur À l'IP₃	56
2.1	Découverte	56
2.2	Signalisation calcique dépendante de l'IP₃R	57
2.3	Structure et organisation de l'IP₃R	59
2.3.1	La région de liaison de l'IP₃	60
2.3.1.1	Le domaine de liaison de l'IP ₃	60
2.3.1.2	Le domaine suppresseur.....	62
2.3.2	Le domaine de modulation	64
2.3.3	Le domaine de formation du canal.....	64
2.3.4	Le domaine de couplage	67

2.3.5	Structure quaternaire.....	68
2.4	Activation du canal	73
2.4.1	Fixation de l'IP ₃	73
2.4.2	Ouverture du canal.....	76
2.5	Régulation de l'activité de l'IP ₃ R.....	77
2.5.1	Régulation par le calcium.....	80
2.5.1.1	Mécanisme de régulation par le calcium.....	81
2.5.1.2	Sites de liaison du calcium.....	82
2.5.2	Régulation par l'ATP	84
2.5.3	Régulation par la calmoduline	84
2.5.4	Régulation par IRBIT.....	85
2.5.5	Régulation par les protéines de la famille Bcl-2	87
2.5.6	Régulation par le cytochrome c	89
2.5.7	Clivage par la caspase-3	89
2.5.8	Régulation par phosphorylation	90
2.5.8.1	Régulation par la PKA	90
2.5.8.2	Régulation par la CaMKII	92
2.5.8.3	Régulation par la PKC	93
2.6	Implications de l'IP ₃ R dans le développement et la vie adulte : contribution de la génétique chez la souris.....	94
2.6.1	Knockout de l'IP ₃ R1	94
2.6.2	Double Knockout IP ₃ R2 et IP ₃ R3	94
2.6.3	Double Knockout IP ₃ R1 et IP ₃ R2	95
3	Le poisson zÈbre	96
3.1	Les avantages du modèle du poisson zÈbre.....	96
3.1.1	Les avantages liés à la biologie du poisson zÈbre	96
3.1.2	Les connaissances du modèle et les banques de données.....	97
3.2	La génétique moléculaire chez le poisson zÈbre	97
3.2.1	Les stratégies d'invalidation	98
3.2.2	Les stratégies de mutagenèse	99
3.2.3	Les stratégies d'ingénierie génomique	100
3.3	Le développement embryonnaire du poisson zÈbre	102

3.3.1	La période de clivage	102
3.3.2	La période de blastulation	102
3.3.3	La période de gastrulation	104
3.3.3.1	L'épibolie	104
3.3.3.2	L'involution	105
3.3.3.3	Les mouvements de convergence et d'extension	106
3.3.4	La période de la segmentation	107
3.3.5	La période de pharyngula	108
3.3.6	La période d'éclosion	109
3.4	Mécanismes moléculaire de la gastrulation	109
3.4.1	Mécanismes de l'épibolie	109
3.4.1.1	Les microtubules	110
3.4.1.2	Les microfilaments d'actine	111
3.4.2	Mécanismes des mouvements de convergence et d'extension	112
3.4.2.1	La voie de signalisation Wnt/PCP	112
3.4.2.2	La voie de signalisation Stat3	114
3.4.2.3	La voie de signalisation des BMP	114
3.4.2.4	La matrice extracellulaire	114
3.5	Implication du calcium au cours du développement du poisson zèbre	115
3.5.1	Période de clivage.....	115
3.5.2	Période de blastulation	117
3.5.3	Période de gastrulation.....	119
3.5.4	Période de segmentation	121
3.6	La machinerie apoptotique au cours du développement du poisson zèbre	124
Introduction au sujet de recherche		126
Résultats		129
1	RÉsumÉ article n°1	131
2	Résumé article n°2	167
3	RÉsumÉ article n°3	198

Discussion et perspectives	238
Annexes	249
BIBLIOGRAPHIE	272

Résumé de la thèse :

L'apoptose est un processus cellulaire fondamental pour l'homéostasie tissulaire. Ce type de mort cellulaire est sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2 qui régulent la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie. Cependant, au-delà de leur rôle dans le contrôle de l'apoptose, les protéines de la famille Bcl-2 peuvent intervenir dans d'autres processus tels que le cycle cellulaire ou le métabolisme.

Au sein du laboratoire, nous nous intéressons tout particulièrement aux rôles non-apoptotiques des protéines Bcl-2 au cours du développement embryonnaire. Grâce à l'utilisation du poisson zèbre, nous avons pu montrer que les protéines de la famille Bcl-2 contrôlent différents processus au cours du développement grâce à leur capacité à réguler l'homéostasie calcique. En effet, nous avons montré que la protéine anti-apoptotique Nrz participe au remodelage du cytosquelette d'actine au cours de l'épibolie en régulant la concentration de calcium cytosolique par son interaction avec le récepteur à l'IP3 (IP3R). Nous avons de plus pu montrer que Nrz diminue la sortie de calcium du réticulum endoplasmique en inhibant la fixation de l'IP3 sur son récepteur.

Nous avons également identifié un nouveau membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, Bcl-wav, spécifiquement exprimée chez les poissons et le xénope. Cette protéine participe à la régulation de l'homéostasie calcique mitochondriale en interagissant avec VDAC. Nous avons de plus montré que cette activité est essentielle pour les mouvements de convergence et d'extension au cours du développement embryonnaire précoce du poisson zèbre.

Apoptosis is a key cellular process for tissue homeostasis. Apoptotic cell death is under control of Bcl-2 family proteins which regulate outer mitochondrial membrane permeability. However, beyond their role in apoptosis, Bcl-2 family proteins are also involved in other cellular processes such as cell cycle or metabolism.

In our laboratory we are interested in non-apoptotic functions of Bcl-2 family proteins in embryonic development. Using zebrafish model we have shown that Bcl-2 proteins control different processes during early development thanks to their ability to regulate calcium homeostasis.

Indeed, we have shown that the anti-apoptotic protein Nrz participates in actin cytoskeleton remodeling during epiboly by regulating cytosolic calcium concentration via an interaction with the IP3 receptor (IP3R). We have also demonstrated that Nrz decreases calcium release from the endoplasmic reticulum by inhibiting IP3 fixation on its receptor.

We have furthermore identified a new pro-apoptotic member of Bcl-2 family, Bcl-wav which is expressed only in fish and frogs. This protein regulates mitochondrial calcium homeostasis by interacting with VDAC. We have moreover shown that this activity is essential for convergence and extension movements during early zebrafish development

ABRÉVIATIONS

3D : Tridimensionnelle

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIF : Apoptosis-inducing factor

AMP : Adénosine monophosphate

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

AP-1 : Activator protein-1

Apaf-1 : Apoptosis protease activating factor-1

APC : Adenomatous polyposis coli

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

Bad : Bcl-2-associated death promoter

Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma/leukemia-2

Bcl-xL : B-Cell lymphoma-extra large

BCR : B-cell receptor

Bfl-1 : Bcl-2-related gene expressed in fetal liver -1

BH : Bcl-2 homology

Bid : BH3 interacting domain death agonist

Bim : Bcl-2 interacting mediator of cell death

Bik : Bcl-2-interacting killer

Bmf : Bcl-2 modifying factor

BMP : Bone morphogenetic protein

Bok : Bcl-2 ovarian killer protein

Boo : Bcl-2 homologue of ovary

CAD : Caspase-activated desoxyribonuclease

CaM : Calmodulin

CaMK : Calmodulin-dependent protein kinase

CaMKK : Calmodulin-dependent protein kinase kinase

CARD : Caspase-recruitment Domain

Caspases : CysteinyI-aspartate-cleaving proteases

CDK : Cyclin-dependent kinase

Ced : Caenorhabditis elegans death

CICR : Calcium-induced calcium release

CKI : Caséine kinase I

COX : Cytochrome c oxydase

CRAC : Calcium-release activated calcium channels

CREB : cAMP response element binding

DAG : Diacylglycerol

DCL : Deep cell layer

DD : Death domain

DED : Death effector domain

DFC : Dorsal forerunner cells

Diablo : Direct IAP-binding protein with low pI

DISC : Death-inducing signaling complex

Diva : Death inducer binding to vBcl-2 and Apaf-1

DKO : Double knock-out

Drp1 : Dynamin-related protein 1

Dsh : Disheveled

EIM : Espace intermembranaire

EndoG : Endonucléase G

ENU : N-ethyl-N-nitrosourea

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

EST : Expression sequence tag

EVL : Enveloping Layer

eYSL : External yolk syncitial layer

FADD : FAS-associated death domain protein

Fz : Frizzled

GFP : Green fluorescent protein

GK : Glucokinase

GRP : Glucose-related protein

GSK3 : Glycogen synthase kinase-3

HMM : Hidden Markov models

hpf : Heures post-fécondation

Hrk : Harakiri

Hsp70 : Heat shock protein

HtrA2 : High temperature requirement A2

IAP : Inhibitor of apoptosis protein

ICAD : Inhibitor of CAD

ICE : Interleukine-1 β converting enzyme

IgH : chaîne lourde de l'immunoglobuline

IL-3 : Interleukine-3

IP₃ : Inositol 1,4,5-trisphosphate

IP₃R : Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor

IRBIT : IP₃R binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate

iYSL : Internal yolk syncitial layer

JAK : Janus kinase

JNK : Jun N-terminal kinase

MAC : Mitochondrial apoptosis-induced channel

MAM : Membranes associées aux mitochondries

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MAPKAK2 : MAP kinase activated protein-kinase 2

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia-1

MBT : Mid-blastula transition

MCU : Mitochondrial calcium uniporter

MEK : MAPK/ERK kinase

Mff : Mitochondrial fission factor

Mfn : Mitofusine

MLCK : Myosin light chain kinase

MME : Membrane mitochondriale externe

MMI : Membrane mitochondriale interne

MMP : Matrix metalloproteinase

MO : Morpholino

mTOR : Mammalian target of rapamycin

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

ncPNA : Negatively charged peptide nucleic acid

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

Opa1 : Optic atrophy 1

PACS-2 : Phosphofurin Acidic Cluster Sorting protein 2

PCP : Planar cell polarity

PDI : Protein disulfide isomerase

pf-MTA : Pre-furrowing microtubule array

PFK : Phospho-fructokinase

PIP₂ : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKA : Protein kinase A

PKB : Protein kinase B

PKC : Protein kinase C

PLC : Phospholipase C

PP1 : Protein phosphatase 1

PP2 : Protein phosphatase 2

PRMT1 : Protein arginine N-methyltransferase 1

PTP : Pore de transition de perméabilité

PTPN5 : Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 5

Puma : p53 upregulated modulator of apoptosis

Raf-1 : Rapidly accelerated fibrosarcoma-1

RaM : Rapid uptake mode

RE : Réticulum endoplasmique

RGS3 : Regulator of G protein signaling 3

Rock : Rho-associated protein kinase

RSK1 : Ribosomal s6 kinase 1

RSV : Rous sarcoma virus

RyR : Ryanodine receptor

SERCA : Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase

Smac : Second mitochondria-derived activator of Caspase

SNC : Système nerveux central

Stat3 : Signal transducer and activator of transcription

tBid : Truncated Bid

TCR : T-cell receptor

TM : Transmembranaire

TNF : Tumor necrosis factor

VDAC : Voltage-dependent anion channel

YSL : Yolk syncytial layer

YSN : Yolk syncytial nuclei

ZEB : Zinc finger E-box-binding homeobox

ZFIN : Zebrafish international network

ZFN : Zinc finger nuclease

ZFP : Zinc finger protein

ZO-1 : Zona occludens-1

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

1 LA FAMILLE DES PROTÉINES BCL-2

La famille Bcl-2 est un ensemble de protéines intracellulaires jouant un rôle clé dans le contrôle de l'apoptose. De plus, il apparaît aujourd'hui qu'elles interviennent également dans d'autres processus cellulaires. Leur dysfonctionnement est souvent associé à la progression tumorale et aux désordres neurodégénératifs. Depuis la découverte du membre canonique de la famille, Bcl-2, il y a une trentaine d'années des homologues de cette protéine ont été caractérisés dans de nombreuses espèces mais les mécanismes moléculaires régissant leur activité, apoptotique ou non restent encore mal définis. Ici, nous présenterons principalement les protéines caractérisées chez les mammifères.

1.1 Découverte

L'étude des réarrangements chromosomiques fréquemment observés dans les lymphomes B humains a conduit à la découverte du gène *bcl-2* (B-cell lymphoma/leukemia-2). Ainsi, Tsujimoto et collaborateurs mirent en évidence la translocation d'une région du chromosome 18 (q21), contenant *bcl-2*, vers le chromosome 14 (q32) (Tsujimoto et al., 1985). Cette translocation place *bcl-2* sous la dépendance du promoteur de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (IgH) conduisant à la surexpression de Bcl-2 par activation transcriptionnelle (**Figure 1**) (Bakhshi et al., 1985; Cleary et al., 1986).

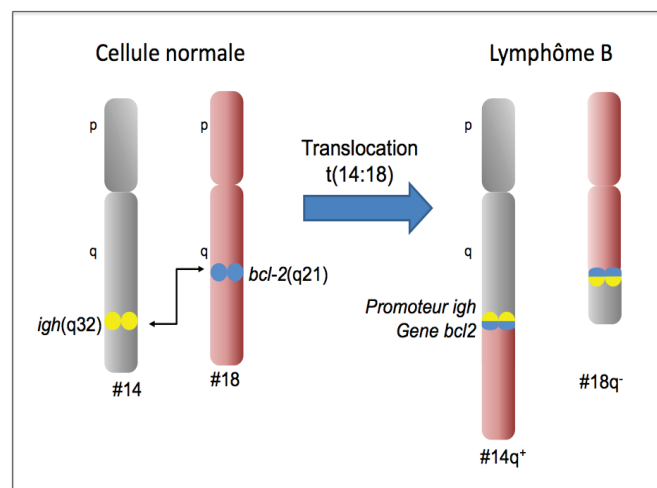


Figure 1 : Translocation du gène *bcl2*

*Dans la majorité des lymphomes B, le gène *bcl-2* est transloqué du chromosome 18 au chromosome 14. Il est alors sous l'influence du promoteur de l'IgH conduisant à la surexpression de la protéine Bcl-2.*

Par analogie avec les gènes *c-myc* ou *cyclin D1*, *bcl-2* fut d'abord considéré comme un simple oncogène conduisant à une prolifération cellulaire incontrôlée. Cependant, en 1988, Vaux et ses collaborateurs, démontrèrent que le produit du gène *bcl-2* définissait une nouvelle classe d'oncogènes, favorisant la survie de cellules lymphoïdes en absence du facteur de croissance Interleukine-3 (IL-3) (Vaux et al., 1988). Deux ans plus tard, il a montré que la protéine Bcl-2 est localisée au niveau des membranes intracellulaires (mitochondrie et réticulum endoplasmique) et est capable d'inhiber l'apoptose (Hockenbery et al., 1990). La protéine Bcl-2 fut ainsi caractérisée comme le membre fondateur d'une nouvelle catégorie de facteurs capables de moduler la mort cellulaire.

Bcl-2 fut ensuite identifiée comme l'homologue du suppresseur d'apoptose Ced-9 caractérisé chez *C.elegans* (Vaux et al., 1992; Hengartner and Horvitz, 1994) mettant ainsi en lumière la conservation évolutive de la machinerie apoptotique, et rendant possible son étude comparative entre le nématode et l'humain. Par la suite, le premier homologue de la famille, Bax, fut mis en évidence. Bax fut identifié par sa capacité à s'hétérodimériser avec Bcl-2 et à induire l'apoptose (Oltvai et al., 1993). Ainsi très vite, le ratio Bcl-2/Bax est apparu comme un déterminant essentiel de la susceptibilité de la cellule à l'apoptose (Korsmeyer et al., 1993; Oltvai et al., 1993).

1.2 Classification et structure

L'alignement des séquences des membres de la famille Bcl-2 a permis d'identifier des séquences conservées d'acides aminés qui ont été appelées domaines BH pour « Bcl-2 Homology » (Reed et al., 1996).

Les protéines Bcl-2 possèdent de un à quatre domaines BH et, d'une manière générale, sur la base de la présence ou non de ces domaines ainsi que de leur rôle dans l'apoptose, ces protéines peuvent être réparties en trois sous familles : les protéines anti-apoptotiques multi-domaines, les protéines pro-apoptotiques multi-domaines et les protéines pro-apoptotiques à BH3-seulement (**Figure 2**). Des orthologues de différents membres de la famille Bcl-2 sont retrouvés chez tous les vertébrés et des homologues de ces protéines sont également présents chez les invertébrés comme la drosophile et le nématode (**Figure 2**). Ici nous n'aborderons que les protéines présentes chez les vertébrés et plus particulièrement celles exprimées chez l'homme et la souris puisque ces espèces représentent les principaux modèles d'études de cette famille de protéines

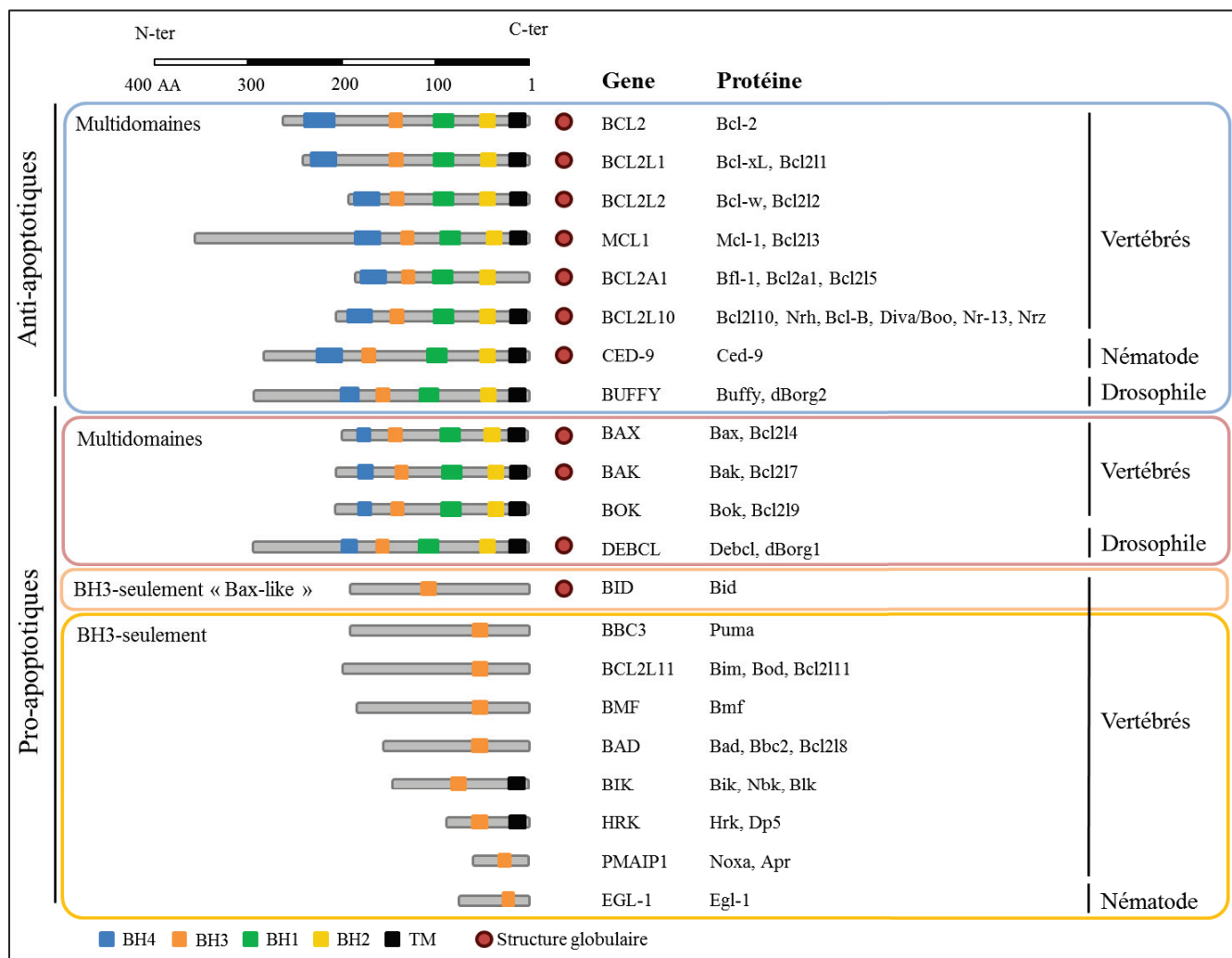


Figure 2 : Classification des protéines de la famille Bcl-2

Représentation schématique de la structure primaire des différents membres de la famille des protéines Bcl-2 chez les mammifères. Ces protéines sont classées en 3 groupes : les protéines anti-apoptotiques, les pro-apoptotiques multi-domaines et les pro-apoptotiques à BH3 seulement. Les domaines BH et transmembranaires (TM) sont représentés (d'après Aouacheria et al., 2012).

1.2.1 Les protéines anti-apoptotiques multi-domaines

En plus de Bcl-2, cinq autres protéines anti-apoptotiques multi-domaines ont été décrites : Bcl-xL (ou Bcl2l1) (Boise et al., 1993), Mcl-1 (ou Bcl2l3) (Kozopas et al., 1993), Bfl-1 (ou Bcl2A1) (Lin et al., 1993; Choi et al., 1995), Bcl-w (ou Bcl2l2) (Gibson et al., 1996) et Bcl2l10 (ou Nr1h3, Diva/Boo, Bcl-B) (Gillet et al., 1995). Ces protéines contiennent 4 domaines d'homologie BH. Ces membres sont principalement caractérisés par leur capacité à inhiber l'apoptose, et par la présence d'une région N-terminale plus ou moins longue, comprenant une ou plusieurs hélices alpha ainsi que le domaine BH4. Ce domaine, qui correspond à une hélice α amphipatique, a été identifié sur la base d'un alignement de séquences entre Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w (Reed et al., 1996) ; son existence est ambiguë dans le cas de Bfl1, Bcl2l10 et Mcl-1. De plus, il est intéressant de noter que le domaine BH4 est le moins conservé de tous les domaines BH (Aouacheria et al., 2005). Cette région N-terminale, et en particulier le domaine BH4, semblent très importants pour l'activité anti-apoptotique de ces protéines. En effet, des mutants de la protéine Bcl-2, dépourvus du domaine BH4, ne sont plus capables de bloquer l'apoptose (Hanada et al., 1995; Huang et al., 1998). Ceci est également le cas pour les protéines Bcl-xL (Clem et al., 1998) et Bcl2l10 (Zhang et al., 2001). De plus, le clivage du domaine BH4 peut également convertir une protéine anti-apoptotique en un facteur pro-apoptotique comme dans le cas de Bcl-2 (Cheng et al., 1997; Kirsch et al., 1999), Bcl-xL (Clem et al., 1998; Basañez et al., 2001) et Bfl-1 (Kucharczak et al., 2005).

À l'exception de Bfl-1, toutes ces protéines contiennent également à leur extrémité C-terminale, un domaine transmembranaire (TM) formé par une hélice α hydrophobe. Ce domaine permet l'insertion des protéines Bcl-2 dans les membranes des organites intracellulaires. En absence du domaine TM, les protéines Bcl-2 sont solubles et cytosoliques. Ainsi, Bcl-2 est localisée dans les membranes externes de la mitochondrie et du noyau ainsi que dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (Krajewski et al., 1993). Il a aussi été montré que la protéine Bcl-2 pouvait être détectée au niveau nucléaire dans les cellules HeLa (Barboule et al., 2009). Cependant le mécanisme de translocation de Bcl-2 dans le noyau reste à définir.

Mcl-1 est également localisée au niveau de la membrane externe mitochondriale ainsi que dans les fractions membranaires du RE, de l'appareil de Golgi et des lysosomes et partiellement dans le cytoplasme (Yang et al., 1995). Mcl-1 peut aussi se localiser au niveau nucléaire (Pawlikowska et al., 2010). De plus, Mcl-1 semble aussi se localiser dans la matrice

mitochondriale où elle participerait au métabolisme énergétique comme nous le verrons dans la partie 1.7.1 (Perciavalle et al., 2012).

Bcl-xL est quant à elle majoritairement cytosolique bien qu'une partie soit également présente dans les membranes (Hsu et al., 1997b). Dans le cytosol, Bcl-xL s'organise sous forme d'homo-dimère ce qui lui permet de masquer son domaine hydrophobe et d'être ainsi soluble (Jeong et al., 2004).

Finalement, Bcl-w est principalement localisée à la mitochondrie et minoritairement à l'enveloppe nucléaire (O'Reilly et al., 2001) alors que Bcl2l10 est localisée à la mitochondrie et au RE (Guillemin et al., 2009).

1.2.2 Les protéines pro-apoptotiques multi-domaines

Les protéines pro-apoptotiques multi-domaines sont au nombre de trois : Bax, Bak et Bok. Ces protéines furent dans un premier temps caractérisées par la présence de trois domaines BH (1 à 3) et l'absence de domaine BH4. Cependant, l'alignement des protéines Bcl-2 sur la base de leur structure a révélé un motif BH4 conservé et présents dans les protéines pro-apoptotiques multi-domaines (Kvansakul et al., 2008; Aouacheria et al., 2012). Ces protéines contiennent également un domaine TM en C-terminal.

Les protéines Bax et Bak sont considérées comme les effecteurs de l'apoptose du fait de leur action à la mitochondrie où leur oligomérisation promeut la perméabilisation de la membrane externe (Voir la partie 1.3.3.2).

En absence de stress, Bax est très majoritairement localisée dans le cytosol (Hsu et al., 1997b). En revanche, après induction de l'apoptose, Bax se relocalise au niveau des mitochondries notamment grâce à son domaine TM C-terminal (Wolter et al., 1997). Récemment il a été montré qu'en fait Bax serait en permanence déplacée de la mitochondrie vers le cytosol par Bcl-xL en absence de stimulus apoptotique (Edlich et al., 2011). Une autre étude a cependant montré que Bcl-xL n'interviendrait pas dans cette redistribution de Bax du de la mitochondrie vers le cytosol. Les auteurs suggèrent qu'en présence de signaux de survie Bax est constitutivement en transit entre la mitochondrie et le cytosol et que lors de la disparition de ces signaux Bax se localiserait à la mitochondrie où elle pourrait être activée si le stress se poursuit (Schellenberg et al., 2013). Finalement en plus de cette localisation dynamique entre le cytosol et la mitochondrie, Bax est également retrouvée au niveau du RE où elle peut aussi induire l'apoptose (Zong et al., 2003).

Bak est quant à elle, une protéine résidente des membranes de la mitochondrie et du RE grâce à son domaine TM (Zong et al., 2003). La localisation de Bak à la mitochondrie semble être

sous la dépendance de son interaction avec le canal VDAC2. Cette interaction inhibe l'oligomérisation de Bak, et donc l'apoptose (Cheng et al., 2003), mais elle est paradoxalement requise pour la mort cellulaire puisque VDAC2 semble nécessaire à l'adressage mitochondrial des protéines Bak néo-synthétisées (Roy et al., 2009a).

Finalement, Bok qui est exprimée spécifiquement dans les gonades (Hsu et al., 1997a), aurait une localisation cytoplasmique et se redistribuerait au niveau nucléaire lors de l'apoptose induite par p53 en réponses aux dommages à l'ADN (Yakovlev et al., 2004). Le mécanisme d'action de Bok semble ainsi distinct de celui de Bax et Bak bien qu'elles partagent une certaine homologie de structure et de séquence.

1.2.3 Les protéines pro-apoptotiques à BH3-seulement

Comme leur nom l'indique les protéines à BH3-seulement ne possèdent que le domaine d'homologie BH3. Il existe 8 membres à BH3 seulement : Bid, Bad, Bim, Bmf, Noxa, Puma, Bik et Hrk. Les membres à BH3-seulement se comportent comme des « senseurs de mort » qui engagent la cellule vers l'apoptose en réponse à un stress.

Bad et Bid sont toutes les deux localisées dans le cytosol sous forme inactive (Zha et al., 1996; Li et al., 1998). Lors d'un stimulus apoptotiques ces protéines sont activées et redirigées vers la mitochondrie.

Bim et Bmf sont également des protéines cytosoliques mais elles possèdent la particularité d'être associées aux microtubules et aux microfilaments d'actine respectivement (Puthalakath et al., 1999, 2001). Ces protéines sont donc considérées comme les sentinelles de la dynamique du cytosquelette.

L'expression de Puma et Noxa est activée au niveau transcriptionnel par la protéine p53 (Oda et al., 2000; Nakano and Vousden, 2001). Ces protéines se localisent directement à la mitochondrie pour favoriser l'apoptose.

Finalement, Bik et Hrk possèdent un domaine hydrophobe C-terminal qui leur permet d'être présentes dans les membranes intracellulaires (Boyd et al., 1995; Inohara et al., 1997). Bik est notamment largement localisée au RE (Germain et al., 2002).

		Protéine	Localisation subcellulaire
Anti-apoptotiques		Bcl-2	MME, RE, membrane nucléaire externe, noyau
		Bcl-xL	Cytosol, MME, RE, membrane nucléaire externe
		Mcl-1	MME, RE, appareil de Golgi, lysosome, cytoplasme, noyau, matrice mitochondriale
		Bfl-1	Cytosol
		Bcl2l10	MME, RE
		Bcl-w	MME, membrane nucléaire externe
Pro-apoptotiques	Multidomaine	Bax	Cytosol, MME, RE
		Bak	MME, RE
		Bok	Cytosol, noyau
	BH3-seulement	Bad	Cytosol
		Bid	Cytosol
		Bim	Cytosol (associées aux microtubules)
		Bmf	Cytosol (associées aux microfilaments d'actine)
		Puma	MME
		Noxa	MME
		Bik	RE, MME
		Hrk	MME, RE

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de la localisation subcellulaire des membres de la famille Bcl-2

1.2.4 Structure des protéines Bcl-2

De manière surprenante, malgré leurs divergences de structure primaire et leurs fonctions opposées, les membres multi-domaines de la famille Bcl-2 présentent des structures tridimensionnelles très similaires. En effet, ces protéines possèdent une structure globulaire composée de 6 à 8 hélices α . Les hélices centrales $\alpha 5$ et $\alpha 6$ sont enfouies au cœur de la

structure (**Figure 3**). De plus, le domaine TM en C-terminal correspond généralement à la dernière hélice de la protéine. Les domaines, BH1, BH2 et BH3 forment une poche hydrophobe à l'intérieur de laquelle le domaine BH3 d'une autre protéine peut se lier (Sattler et al., 1997; Petros et al., 2004). Mcl-1, en plus de cette structure globulaire, possède un long domaine N-terminal non structuré en amont de son domaine BH4 contenant notamment un domaine PEST jouant un rôle dans la stabilité de la protéine.

La protéine Bid bien que classée dans le groupe des BH3-seulement présente le même repliement que les protéines à multi-domaines et est composée de huit hélices α (**Figure 3**) (Chou et al., 1999; McDonnell et al., 1999). Ainsi, Bid est considéré comme un membre à part de la classe des BH3-seulement. En effet, en plus d'une similarité structurale, elle semble également partager des similitudes fonctionnelles avec Bax notamment au niveau du mécanisme d'insertion dans la membrane externe mitochondriale (Billen et al., 2008).

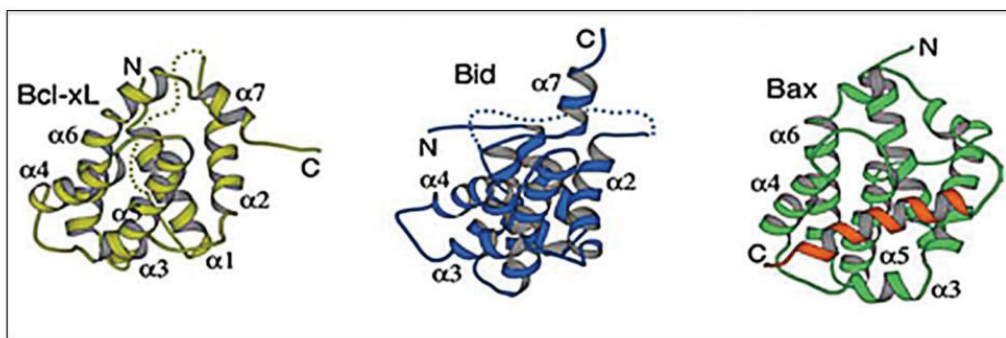


Figure 3 : Structure 3D des protéines de la famille Bcl-2

De gauche à droite sont représentés un membre de chaque sous famille. Bcl-xL, à gauche, membre anti-apoptotique, Bid, au centre, membre pro-apoptotique à BH3-seulement et enfin Bax, membre pro-apoptotique multi-domaines. Le domaine TM de Bax replié dans la poche hydrophobe est indiqué en orange. Les structures 3D sont très similaires (d'après Yan et al., 2005).

1.3 Implications des protéines Bcl-2 dans l'apoptose

1.3.1 L'apoptose

1.3.1.1 Généralités

L'apoptose est un type spécifique de mort cellulaire programmée se produisant dans les tissus des organismes multicellulaires, en conditions physiologiques ou pathologiques. Cette mort cellulaire est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire, permettant ainsi la

régulation du nombre de cellules d'un tissu ou d'un organisme. L'apoptose joue un rôle déterminant dans l'embryogénèse, dans l'homéostasie tissulaire ou encore dans le fonctionnement du système immunitaire. Le dérèglement du processus d'apoptose ou de son contrôle est à l'origine de nombreuses maladies comme par exemple le cancer lors d'un défaut d'apoptose (Hanahan and Weinberg, 2000) ou les maladies neurodégénératives ou auto-immunes lors d'un excès d'apoptose (Eguchi, 2001; Mattson, 2004).

Le programme de mort cellulaire par apoptose se déroule selon trois phases : (1) la phase d'initiation, étape réversible, résultant de la perception par la cellule de signaux apoptotiques. L'apoptose peut être induite par des signaux d'origines diverses, physiologiques ou pathologiques, intra- ou extracellulaires. La carence en facteurs de croissance essentiels, l'activation de certains récepteurs membranaires (TNF, Fas) ou nucléaires (corticoïdes), certaines infections virales ou bactériennes, les agressions physico-chimiques (irradiations, drogues...) peuvent être à l'origine de l'initiation du programme apoptotique. (2) La phase de régulation où les cellules intègrent les « signaux de mort » grâce à l'intervention de médiateurs intracellulaires anti- ou pro-apoptotiques comme les protéines de la famille Bcl-2. Selon son type et le contexte dans lequel se trouve la cellule lors de la perception du stimulus, elle est orientée soit vers la survie soit vers la mort. (3) La phase d'exécution où les cellules s'engagent dans l'apoptose de manière irréversible.

Il existe deux voies pouvant conduire à l'apoptose des cellules :

La première, dite voie extrinsèque, fait intervenir des récepteurs de mort qui permettent la transduction de signaux externes de mort.

La deuxième, dite voie intrinsèque, qui met la mitochondrie au centre des événements apoptotiques, conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et au relargage de facteurs apoptogènes.

Ces deux voies aboutissent à l'activation des principaux effecteurs de la mort cellulaire programmée : les caspases.

1.3.1.2 Les caspases

Les études génétiques conduites chez *C.elegans* ont mis en évidence le rôle central de protéases particulières, les caspases (Cysteiny-ASPartate-cleaving proteASES) au cours de l'apoptose (Li and Yuan, 2008). Ce sont des protéases intracellulaires à cystéine qui appartiennent à la famille des protéases ICE (Interleukine-1 β Converting Enzyme). Toutes les caspases ont une structure tridimensionnelle conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes, composés d'un pro-domaine N-terminal de taille variable,

suivi du domaine catalytique (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). L'activation des caspases peut nécessiter un clivage pour démasquer le site catalytique. Les caspases sont principalement localisées dans le cytoplasme, mais elles peuvent aussi être retrouvées au niveau du noyau, de la mitochondrie et du RE. À ce jour, 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères et classées en trois groupes : les caspases de l'inflammation (caspases 1, 4, 5 et 14), les caspases « apoptotiques » initiatrices (2, 8, 9, 10 et 12) et les caspases « apoptotiques » effectrices (3, 6 et 7). Les caspases 11 et 13 n'ont pas d'homologues identifiés chez l'humain. Dans ce manuscrit les caspases de l'inflammation ne seront pas traitées.

1.3.1.2.1 Les caspases initiatrices

Les caspases initiatrices constituent le point central de l'entrée en apoptose d'une cellule. Une fois activées, elles déclenchent la cascade protéolytique conduisant à la mort de la cellule. Elles sont caractérisées par la présence d'un long domaine N-terminal. Ce pro-domaine est composé de domaines d'interaction, également appelés domaines de recrutement, interagissant avec d'autres caspases et avec des protéines adaptatrices. Les caspases 8 et 10 possèdent deux domaines DED (Death Effector Domain) en N-terminal alors que les caspases 2, 9 et 12 possèdent un domaine CARD (CASPase-Recruitment Domain). Ces modules guident l'oligomérisation des caspases initiatrices, nécessaire à leur propre activation (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). En effet, elles existent à l'état inactif sous forme de monomère et leur activation est dépendante de leur dimérisation, mais ne nécessite pas obligatoirement d'étape de clivage. Au sein de chacune des voies d'activation de l'apoptose, l'activation des caspases initiatrices nécessite l'intervention d'une protéine adaptatrice participant à l'assemblage d'un complexe d'initiation de la mort cellulaire. C'est au sein de ce complexe que la caspase initiateur va s'auto-activer, suite à son oligomérisation.

1.3.1.2.2 Les caspases effectrices

Les caspases effectrices interviennent en aval des caspases initiatrices et ont pour cible des composants essentiels à la survie de la cellule. Parmi ces caspases, on compte les caspases 3, 6 et 7. Elles se distinguent par l'absence de domaine de recrutement présent dans les caspases initiatrices. Ces caspases effectrices sont présentes sous forme inactive dans la cellule. Elles sont activées par clivage protéolytique par les caspases initiatrices (Pop and Salvesen, 2009). Ces caspases agissent en cascade et peuvent également activer des caspases plus en amont afin d'amplifier le processus protéolytique. La caspase 3 joue un rôle central dans l'exécution de l'apoptose en étant activée à la fois par les caspases initiatrices 8 et 9. De

plus, elle a la capacité de s'auto-activer. Son activation aboutit au clivage d'un nombre important des constituants cellulaires vitaux. L'activation de la caspase 3 est souvent considérée comme un point de non-retour de l'apoptose. Les principaux substrats de la caspase 3 sont des protéines du cytosquelette, des facteurs anti-apoptotiques, des enzymes du métabolisme et de nombreuses nucléases. Par exemple, la protéolyse du domaine inhibiteur de l'endonucléase CAD (ICAD) conduit à l'activation de CAD et donc à la fragmentation de l'ADN, un critère typique de l'apoptose. À ce jour, environ 400 substrats de caspases ont été caractérisés, et classés dans une banque de données (www.casbah.ie).

1.3.2 La voie extrinsèque de l'apoptose

Chez les mammifères, la voie extrinsèque de l'apoptose, ou voie des récepteurs de mort, est impliquée dans l'élimination des cellules indésirables au cours du développement embryonnaire et lors de l'immuno-surveillance anti-tumorale. La voie des récepteurs de mort est initiée par des facteurs externes à la cellule, et commence par l'activation d'un récepteur (liaison à son ligand) au niveau de la surface cellulaire. Ces récepteurs transmembranaires appartiennent tous à la superfamille du TNF. Cette famille compte une trentaine de membres et comprend à la fois les récepteurs et leurs ligands naturels (Aggarwal, 2003).

Les récepteurs sont composés de trois domaines : un extracellulaire, un transmembranaire et un intracellulaire. Le domaine extracellulaire est caractérisé par la présence d'un ou plusieurs domaines riches en cystéines favorisant la liaison entre le ligand et son récepteur. La région intracellulaire possède un domaine cytosolique conservé appelé domaine de mort (DD : Death Domain), capable d'interagir avec d'autres composants de la machinerie apoptotique. Les ligands de ces récepteurs sont également des molécules transmembranaires impliquant des interactions cellule/cellule pour permettre la fixation du ligand sur son récepteur.

La transduction du signal par les récepteurs de mort est initiée par l'oligomérisation du récepteur, sous forme de trimère, via son domaine DD (Curtin and Cotter, 2003; Mollinedo and Gajate, 2006). De façon générale, cette oligomérisation entraîne un réarrangement membranaire qui mène au recrutement de protéines adaptatrices possédant aussi un domaine DD. Ces protéines adaptatrices, comme FADD (FAS-associated Death Domain protein), possèdent de plus un domaine effecteur de mort (DED : Death Effector Domain) capable d'interagir avec les caspases initiatrices (Caspases 2, 8 et 10) (Berglund et al., 2000), qui contiennent aussi des domaines homologues DED au niveau de leurs pro-domaines. Le recrutement des caspases au niveau du complexe des récepteurs de mort forme le DISC

(Death-Inducing Signaling Complex) et provoque l'auto-activation de la caspase-8, qui élimine son pro-domaine, et se retrouve libéré sous forme active dans le cytosol (Micheau and Tschopp, 2003). À partir de ce moment, deux voies sont ouvertes en fonction du type cellulaire : soit, la caspase 8 va activer directement la caspase 3, soit elle va cliver la protéine à BH3-seulement Bid (**Figure 4**).

En effet, le domaine BH3 de Bid est précédé d'une longue boucle d'une quarantaine d'acides aminés contenant des sites de clivage à la caspase-8. Une fois activée, la caspase-8 clive alors Bid en « truncated Bid » noté tBid (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Bid est normalement cytosolique mais le clivage protéolytique de Bid conduit à l'exposition d'un résidu glycine, qui est rapidement myristoylé, adressant tBid à la mitochondrie (Zha et al., 2000). Une fois à la mitochondrie, tBid active à son tour Bax et Bak reliant ainsi la voie des récepteurs de mort à la voie intrinsèque de l'apoptose

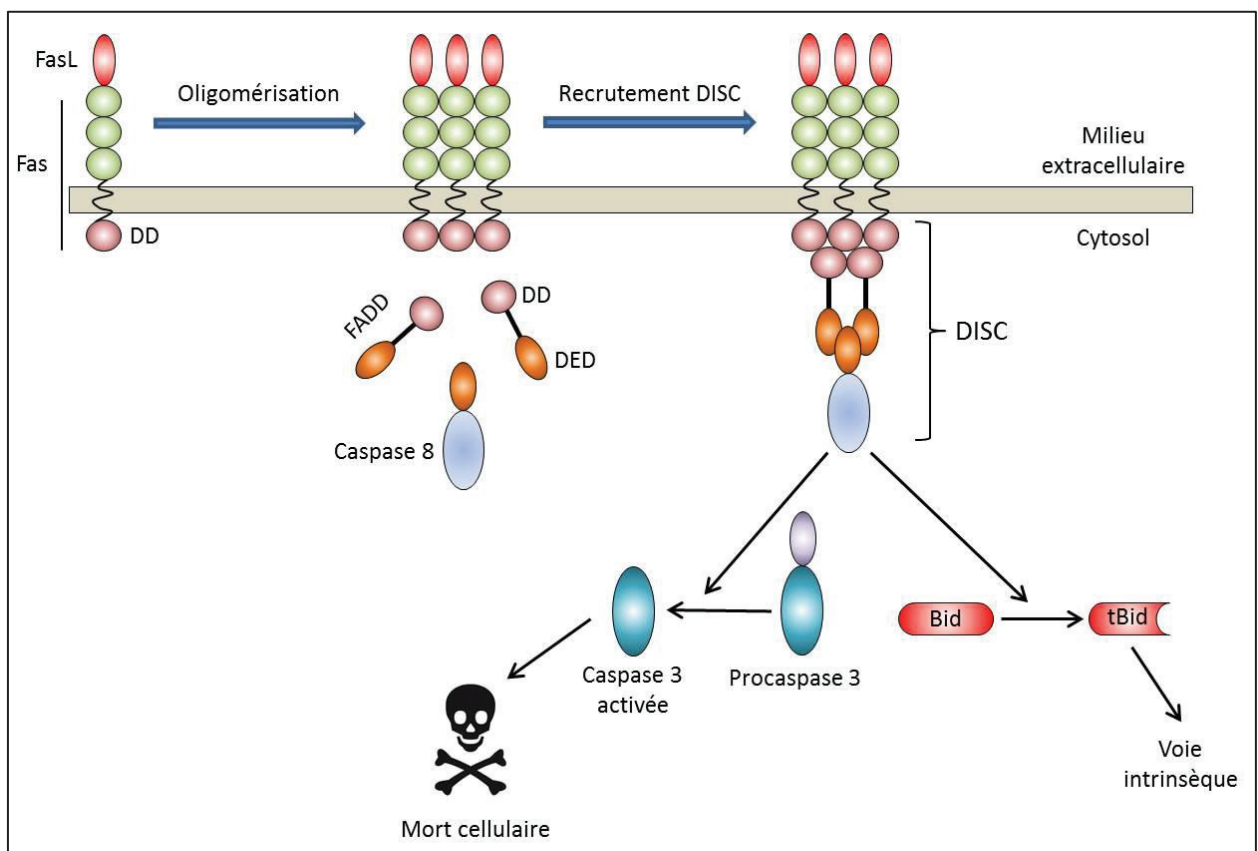


Figure 4 : La voie des récepteurs de mort, exemple de FasL et Fas

FasL se lie à son récepteur Fas favorisant sa trimérisation via ses domaines DD et le recrutement de la molécule adaptatrice FADD au niveau du domaine intracellulaire du récepteur. FADD recrute à son tour la procaspase 8 par l'intermédiaire de son domaine

DED. L'ensemble forme le DISC favorisant la dimérisation et l'activation de la caspase 8. L'auto-clivage de la caspase 8 conduit à l'activation de la caspase 3 et la mort cellulaire.

1.3.3 La voie intrinsèque de l'apoptose

La voie intrinsèque, ou voie mitochondriale, peut être activée suite à divers signaux comme les radiations ionisantes, les médicaments utilisés en chimiothérapie, les infections virales, les dommages à l'ADN ou encore la privation de facteurs de croissance. Cette voie se caractérise par la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME) soit par les protéines Bax et Bak soit par l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (PTP). Le premier mécanisme est entièrement sous la dépendance des protéines Bcl-2 et repose sur l'activation des protéines pro-apoptotiques alors que le second fait principalement intervenir le calcium. Cependant les protéines de la famille Bcl-2 pouvant réguler les flux calciques, elles contrôlent également dans une certaine mesure l'ouverture du PTP. Dans tous les cas, la perméabilisation de la MME aboutit à la libération vers le cytosol de facteurs apoptogènes de l'espace inter-membranaire mitochondrial (EIM). Ces facteurs activent par la suite les caspases pour aboutir à la mort cellulaire (**Figure 5**).

1.3.3.1 Principaux facteurs apoptogènes

1.3.3.1.1 Le cytochrome c

Le cytochrome c est une petite hémoprotéine (environ 12 kDa) chargée positivement et localisé dans l'EIM. Le cytochrome c est synthétisé dans le cytosol, puis est transporté dans la mitochondrie où il acquiert un groupement hémunique. Dans l'EIM, le cytochrome c intervient dans le transport des électrons de la chaîne respiratoire entre les complexes III et IV.

Son rôle dans la mort cellulaire programmée est clairement établi aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Kluck et al., 1997; Li et al., 1997; Yang et al., 1997; Brustugun et al., 1998; Garland and Rudin, 1998). Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit, en présence d'ATP, avec la protéine Apaf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1) Il s'agit d'une protéine cytosolique de 130 kDa, qui possède un domaine CARD homologue à celui de la caspase-9 (Zou et al., 1997). Le cytochrome c forme donc un complexe avec Apaf-1 mais aussi avec la pro-caspase 9. Ce complexe appelé « apoptosome » conduit à l'activation de la caspase initiateur 9 de façon ATP-dépendant (Acehan et al., 2002). Une fois activée la caspase-9 clive la caspase-3 conduisant à l'apoptose des cellules.

De plus, il a été montré que le cytochrome c libéré, pouvait également interagir avec d'autres protéines intracellulaires afin d'induire l'apoptose. En effet, le cytochrome c peut se lier aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et ainsi inhiber leur effet anti-apoptotique (Moradi-Améli et al., 2002). Il serait également capable d'interagir avec le récepteur à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃R) situé au RE provoquant alors un relargage massif du calcium fatal pour la cellule (Boehning et al., 2003) (Voir aussi partie 2.5.6).

1.3.3.1.2 L'AIF

L'AIF (Apoptosis-inducing Factor) est une protéine de 57 kDa, située au niveau de l'EIM (Susin et al., 1999). Comme le cytochrome c, l'AIF est codée par un gène nucléaire et importée à la mitochondrie. Une fois libérée dans le cytosol, l'AIF migre dans le noyau où elle se lie à l'ADN. Cette liaison à l'ADN induit une condensation périphérique de la chromatine et une fragmentation de l'ADN. Cette fragmentation ferait intervenir des endonucléases comme CAD ou l'Endonucléase G (Wang et al., 2002).

1.3.3.1.3 L'Endonucléase G

L'endonucléase G (EndoG) est une nucléase mitochondriale de 30 kDa codée par un gène nucléaire qui interviendrait dans la réplication de l'ADN mitochondrial. Au cours de l'apoptose, EndoG est libérée de la mitochondrie vers le noyau où elle va cliver l'ADN en fragments nucléosomiques (Li et al., 2001).

1.3.3.1.4 Les inhibiteurs des IAP

Les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) sont des inhibiteurs intracellulaires des caspases qui peuvent empêcher l'activation des pro-caspases et inhiber les caspases déjà activées (Srinivasula and Ashwell, 2008).

Lors du déclenchement de l'apoptose les IAPs peuvent être inhibées par des protéines libérées par la mitochondrie notamment les protéines Smac/Diablo et Htra2/Omi. La première se lie aux IAPs empêchant leur interaction avec les caspases (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000) alors que la seconde clive les IAPs les rendant alors inactives (Verhagen et al., 2002).

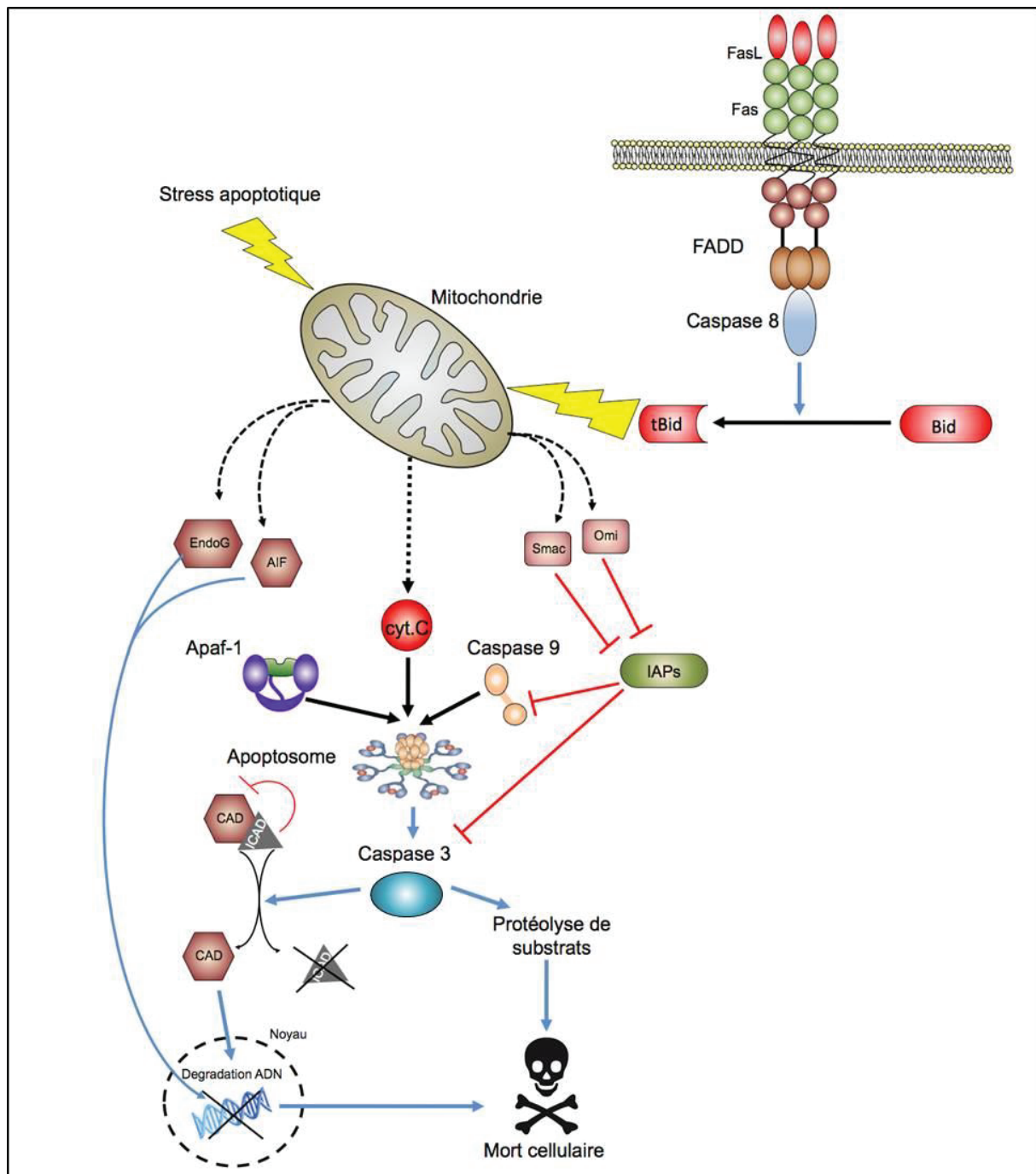


Figure 5 : Représentation de la voie mitochondriale apoptotique

Au cours de l'apoptose, la perméabilisation de la mitochondrie entraîne la libération de facteurs apoptogènes dans le cytosol aboutissant à l'activation de la caspase 3 et la mort cellulaire. D'un autre côté, des nucléases (EndoG, AIF et CAD) sont transloquées au noyau et dégradent l'ADN en fragments inter-nucléosomiques. Smac/Diablo et Htra2/Omi inhibent les IAPs. Le cytochrome c participe à la formation de l'apoptosome. Les voies intrinsèque et extrinsèque sont connectées par la protéine pro-apoptotique tBid.

1.3.3.2 Voie dépendante de Bax et Bak

1.3.3.2.1 Activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak

En absence de stress, les membres pro-apoptotiques sont inhibés par l'interaction de leur domaine BH3 avec la poche hydrophobe (domaines BH1, BH2 et BH3) formée au sein des protéines anti-apoptotiques (Petros et al., 2004). Selon le modèle dit du « rhéostat », (Korsmeyer et al., 1993), une inhibition de l'activité des membres anti-apoptotiques ou une surexpression des membres pro-apoptotiques conduit à un équilibre en faveur des protéines pro-apoptotiques aboutissant à l'apoptose. Suite à un stress, les membres pro-apoptotiques de type BH3-seulement sont activés et initient la cascade apoptotique en induisant l'activation de Bax et Bak résultant d'un changement conformationnel. Deux modèles ont été proposés pour expliquer le mode d'action des BH3-seulement dans l'activation des protéines pro-apoptotiques multi-domaines : le modèle d'activation directe et celui d'activation indirecte.

1.3.3.2.1.1 Modèle d'activation directe

Ce modèle se base sur l'existence de deux types de protéines à BH3-seulement : les activateurs et les sensibilisateurs. Alors que les activateurs semblent interagir avec tous les membres anti-apoptotiques, les sensibilisateurs posséderaient en revanche un profil d'interaction plus restreint (**Figure 6**) (Chen et al., 2005; Certo et al., 2006; Rautureau et al., 2012).

Le premier groupe composé de Bid, Bim et Puma serait capable de se lier avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak et de les activer directement. En effet, des études ont montré que ces trois protéines ou leurs domaines BH3 sont capables d'induire directement l'oligomérisation de Bax (Kuwana et al., 2002; Letai et al., 2002; Gallenne et al., 2009). Cette année, le changement de conformation de Bax induit par la fixation du domaine BH3 de Bid et Bim a d'ailleurs pu être observé par cristallographie confirmant leur capacité à activer directement les membres pro-apoptotiques multi-domaines (Czabotar et al., 2013). Dans ce modèle, les protéines activatrices seraient séquestrées par les membres anti-apoptotiques. Suite à un stress, le deuxième groupe des BH3-seulement, les sensibilisateurs, seraient alors activés et permettraient de libérer les activateurs en interagissant avec les protéines anti-apoptotiques (**Figure 7**) (Chipuk and Green, 2008).

Récemment, une équipe a affirmé avoir prouvé la validité de ce modèle en montrant que des souris triple knockout pour *bid/bim/puma* présentent le même phénotype que les souris double knockout pour *bax/bak* (Ren et al., 2010). De plus, les auteurs montrent que les cellules issues de ces souris sont résistantes à de nombreux stimuli apoptotiques. Cependant,

les conclusions de cette étude ont été remises en question dans un éditorial affirmant que le phénotype des souris triple knockout *bim/bid/puma* est moins sévère que celui des souris double knockout *bax/bak* et que les cellules issues des premières souris sont moins résistantes à l'apoptose que celles issues des secondes (Villunger et al., 2011). D'après les auteurs certains résultats seraient mêmes plutôt en faveur du modèle d'activation indirecte.

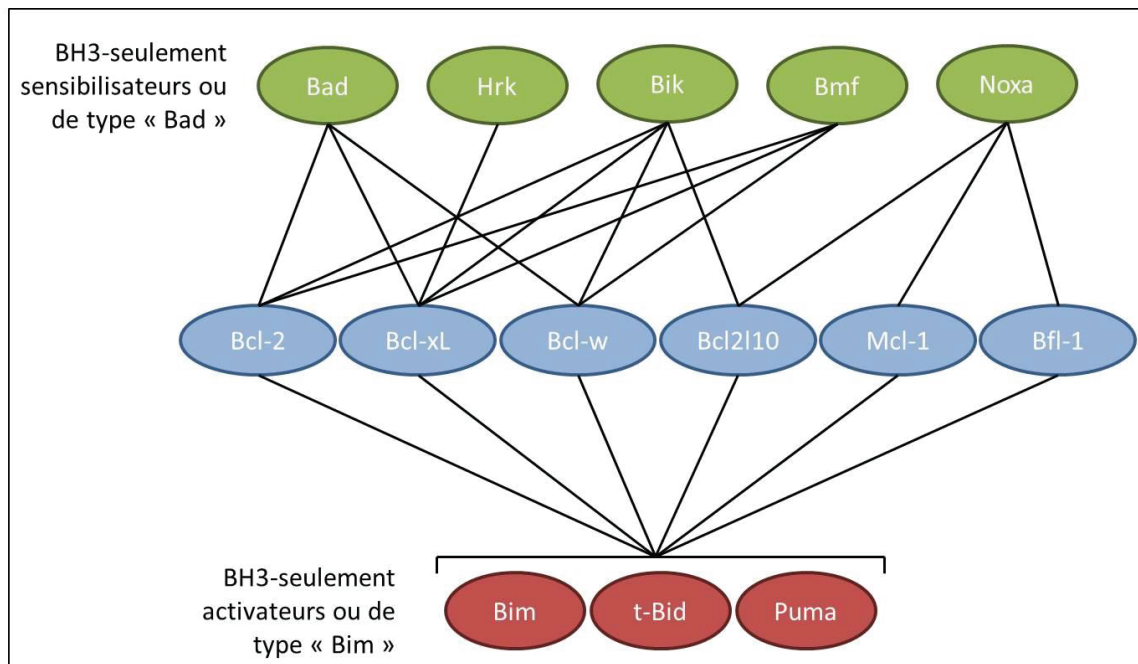


Figure 6 : Modèle d'interaction entre les membres pro-apoptotiques à BH3 seulement et les membres anti-apoptotiques

Bid, Puma et Bid seraient des interacteurs ubiquitaires tandis que Bad, Bmf, Bik, Hrk et Noxa seraient des interacteurs sélectifs.

1.3.3.2.1.2 Le modèle d'activation indirecte

Dans ce modèle, les BH3-seulement n'activeraient pas directement les protéines Bax/Bak, mais agiraient en neutralisant les protéines anti-apoptotiques, libérant ainsi Bax et Bak. De nouveau, les membres à BH3-seulement sont divisés en deux sous-groupes, les protéines de type Bim (Bim, Bid, Puma) capables d'interagir et d'inhiber tous les membres anti-apoptotiques, tandis que celles de type Bad (Bad, Bik, Hrk, Noxa et Bmf), ont un profil d'interaction plus restreint mais correspondant à celui du modèle direct (**Figure 6**).

Dans ce modèle, Bax et Bak existeraient sous deux conformations : une conformation ouverte où leur BH3 est exposé et une conformation fermée où il est masqué (Willis et al., 2007). Dans les cellules saines, les protéines Bax et Bak en conformation ouverte seraient

séquestrées par les membres anti-apoptotiques alors que les protéines en conformation fermée seraient libres mais inactives. Après activation du processus d'apoptose, un membre à BH3-seulement romprait l'interaction de Bax/Bak avec les membres anti-apoptotiques. Ainsi libérées, Bax/Bak en conformation ouverte, seraient libres d'interagir avec un monomère de Bax ou Bak en conformation fermée et de l'activer, conduisant à l'oligomérisation de ces protéines dans la MME et à la sortie du cytochrome c (**Figure 7**) (Willis et al., 2007).

Chaque modèle possède des preuves expérimentales permettant de l'étayer. Il a donc été proposé récemment que ces deux modèles pourraient coexister. Ainsi les protéines de type Bad ne feraient que libérer Bax et Bak des anti-apoptotiques alors les protéines de type Bim après les avoir libérés permettrait aussi leur activation (Mérino et al., 2009).

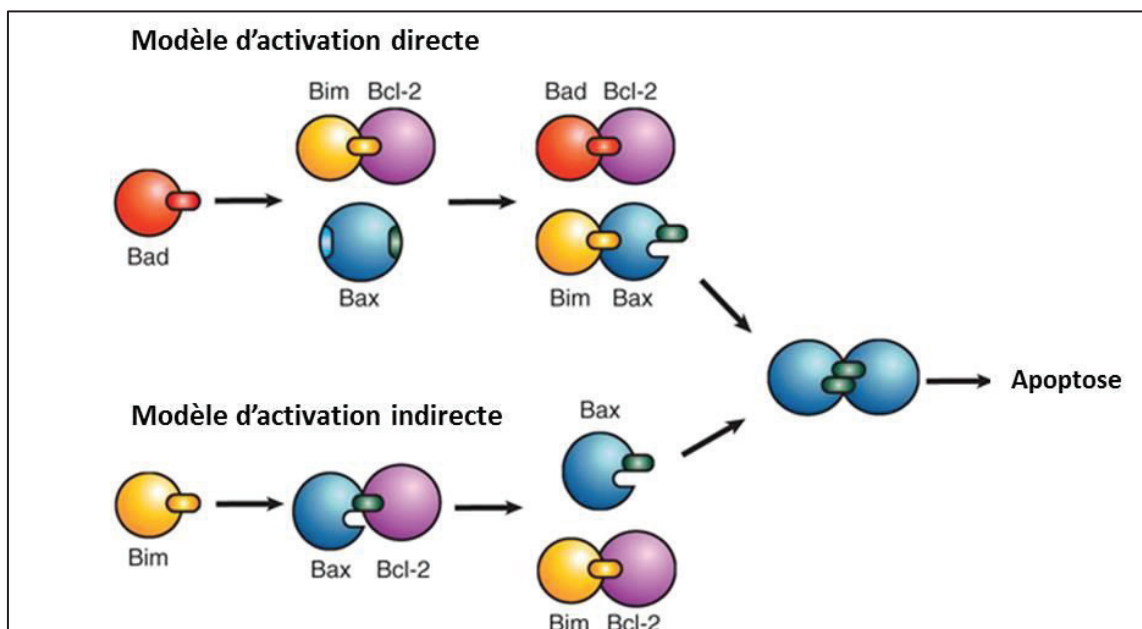


Figure 7 : Les modèles d'activation directe et indirecte

Représentation schématique des modèles d'activation directe et indirecte des membres pro-apoptotiques multi-domaines (d'après Giam et al., 2008).

1.3.3.2.2 Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par Bax et Bak

Une fois activées les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak participent à la perméabilisation de la MME permettant ainsi le relargage des facteurs apoptogènes responsable de l'activation des caspases. Bax et Bak sont requis pour la perméabilisation de la MME puisque l'inactivation de ces deux protéines prévient l'apoptose induite par de nombreux stimuli (Wei et al., 2001). L'activation de Bax et Bak s'accompagne de

changements conformationnels permettant leur oligomérisation (Eskes et al., 2000; Wei et al., 2000). Cette étape d'oligomérisation est essentielle pour induire la perméabilisation de la MME puisque des mutants de Bax et Bak ne pouvant plus s'oligomériser perdent leur capacité à induire l'apoptose (George et al., 2007; Dewson et al., 2008). Bax et Bak semblent se dimériser grâce à une interaction entre le domaine BH3 d'un monomère et les hélices $\alpha 4$ et 5 d'un autre monomère. Les dimères pourraient ensuite s'associer entre eux par une interaction entre les hélices $\alpha 6$ des différentes sous-unités. De plus, Bax et Bak pourraient former des hétéro-oligomères (Dewson et al., 2008, 2009, 2012). Finalement, il est intéressant de noter que l'oligomérisation de Bax semble également facilitée par Drp-1, un composant essentiel de la machinerie de fission de la mitochondrie (Montessuit et al., 2010).

Le mécanisme permettant la perméabilisation de la MME par Bax et Bak fait toujours l'objet de nombreuses recherches. À ce jour, deux principaux modèles non mutuellement exclusifs ont été proposés : la formation de canaux protéiques et la formation de pores lipidiques.

1.3.3.2.2.1 Formation de canaux protéiques

L'hypothèse selon laquelle Bax et Bak pourraient former des pores protéiques dans la MME provient de leur similarité structurale avec des toxines bactériennes connues pour former des pores (Suzuki et al., 2000). Bax peut d'ailleurs former des canaux dans des membranes artificielles (Antonsson et al., 1997; Schlesinger et al., 1997). Ainsi, il a été proposé que Bax et Bak puissent s'assembler dans la MME pour former le canal MAC (Mitochondria apoptosis-induced channel) permettant le passage de molécules de l'EIM vers le cytosol (Dejean et al., 2005). Bax et Bak sont bien capables de former un tel canal dans des mitochondries isolées mais sa taille ne semble pas suffisante pour laisser passer toutes les protéines relarguées par la mitochondrie au cours de l'apoptose (Martinez-Caballero et al., 2009).

Il a été également proposé que Bax et Bak puissent s'associer à des canaux mitochondriaux comme le PTP ou VDAC. Cependant, l'invalidation de la Cyclophiline D, un acteur essentiel de l'ouverture du PTP, ou des trois isoformes de VDAC n'empêche pas la perméabilisation de la MME écartant un rôle pour ces canaux dans la perméabilisation induite par Bax et Bak (Baines et al., 2005, 2007).

1.3.3.2.2.2 Formation de pores lipidiques

Le deuxième modèle proposé suggère que Bax et Bak s'associent aux lipides de la MME entraînant une déformation de la membrane et la formation d'un pore lipidique

(Basañez et al., 2002; Kuwana et al., 2002). Cette hypothèse est corroborée par des études structurales des pores formés par Bax en bicouche lipidique (Qian et al., 2008; Schafer et al., 2009; Xu et al., 2013). Cependant, les preuves de l'existence de pores lipidiques dans des mitochondries sont, à ce jour, inexistantes

1.3.3.3 Voie dépendante du calcium

1.3.3.3.1 Ouverture du PTP

Le PTP est un pore protéique mitochondrial qui est ouvert en réponse à une augmentation de la concentration de calcium dans la mitochondrie. Son ouverture est également stimulée par le phosphate inorganique et les acides gras (Rasola and Bernardi, 2007). L'existence de ce pore est communément acceptée, en revanche son identité moléculaire est toujours inconnue bien qu'une étude récente suggère que l'ATP synthase F0/F1 mitochondriale pourrait former le PTP (Giorgio et al., 2013). La seule protéine admise pour jouer un rôle dans l'ouverture du PTP est la Cyclophiline D qui activerait l'ouverture du pore après fixation sur ce dernier. Par ailleurs, il apparaît clairement que l'ouverture du PTP est entièrement dépendante du calcium présent dans la matrice mitochondriale (Bernardi, 2013).

La mitochondrie joue un rôle tampon vis à vis l'augmentation de la concentration cytosolique de calcium en recapturant en permanence ces ions qui sont notamment essentiels pour le fonctionnement du métabolisme oxydatif (Hajnóczky et al., 1995; Robb-Gaspers et al., 1998). A ce titre, la mitochondrie et le RE, principal réservoir de calcium pour la cellule, sont étroitement liés (Shore and Tata, 1977; Meier et al., 1981) et semblent même physiquement associés au niveau de domaines particuliers, les MAM (Mitochondria-associated membranes) (Vance, 1990). Les MAM sont enrichies en protéines transmembranaires reliant les deux organelles, telles que PACS-2 ou la Mitofusin-2, mais aussi en IP₃R, l'un des principaux canaux calciques du RE (Simmen et al., 2005; de Brito and Scorrano, 2008). Ces points de contact jouent donc un rôle essentiel dans le transfert de calcium entre le RE et la mitochondrie (Rizzuto et al., 1993, 1998). Dans les MAM, l'IP₃R semble appartenir à un complexe comprenant également la protéine Grp75 et le canal mitochondrial VDAC (Szabadkai et al., 2006). Ce dernier est impliqué entre autres dans le transport des ions calcium à travers la MME (Gincel et al., 2001; Rapizzi et al., 2002). Au niveau de ces points de contacts la concentration en calcium peut atteindre des concentrations beaucoup plus élevées que dans le cytosol (Csordás et al., 2010), ce qui coïncide avec une fonction spécialisée des MAM dans les échanges calciques RE/mitochondrie. En effet,

l'uniporteur calcique mitochondrial (MCU pour Mitochondrial Calcium Uniporter) qui permet le passage du calcium de l'EIM vers la matrice mitochondriale nécessite de hautes concentrations de calcium pour s'ouvrir (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011). Ainsi, le calcium relargué depuis le RE peut rapidement être recapté par la mitochondrie au niveau des MAM grâce à l'action combinée de VDAC et MCU (**Figure 8**) (Giorgi et al., 2009).

En plus du canal MCU, le calcium peut transiter de l'EIM vers la matrice par le mécanisme RaM (Rapid uptake Mode). Le RaM permet une entrée rapide de calcium dans la matrice mais ce mécanisme est en revanche inhibé par des hautes concentrations de calcium cytosolique (Gunter et al., 2004). Ceci suggère qu'il existe deux modes d'entrée du calcium dans la matrice mitochondriale qui sont différenciellement activés selon la concentration cytosolique de calcium (**Figure 8**).

La sortie du calcium de la matrice mitochondriale s'effectue via trois mécanismes : des échanges $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ et l'ouverture transitoire du PTP (**Figure 8**). Les antiports $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ sont décrits depuis longtemps mais l'identité des échangeurs n'a été identifiée que récemment (Jiang et al., 2009; Palty et al., 2010). En plus de ces échanges d'ions, l'ouverture transitoire du PTP semble jouer un rôle dans la sortie de calcium depuis la mitochondrie. (Hüser and Blatter, 1999; Petronilli et al., 1999). Ce relargage de calcium par le PTP pourrait participer à la signalisation calcique notamment dans les neurones et les cardiomyocytes (Elrod et al., 2010; Barsukova et al., 2011).

De nombreux types de stress et notamment ceux touchant le RE provoquent une augmentation massive de la concentration cytosolique de calcium. L' IP_3R est d'ailleurs impliqué dans l'induction de l'apoptose par certains de ces stimuli puisque son invalidation réduit considérablement la mort cellulaire (Jayaraman and Marks, 1997; Sugawara et al., 1997; Szalai et al., 1999; Blackshaw et al., 2000). Du fait de sa proximité avec le RE, la mitochondrie fait alors face à de très hautes quantités de calcium qui mettent à contribution ses mécanismes tampon. Cependant, alors que le calcium est un élément indispensable au bon fonctionnement de la mitochondrie, une surcharge de calcium s'avère en revanche fatale. En effet, l'accumulation de calcium dans la matrice mitochondriale conduit à l'ouverture persistante du PTP qui permet alors le passage dans l'EIM de nombreuses molécules possédant une taille inférieure à 15 kDa. Ceci entraîne alors la dépolarisation de la membrane mitochondriale interne, causant l'arrêt de la phosphorylation oxydative, le gonflement de la matrice mitochondriale et finalement la rupture de la MME conduisant au relargage des facteurs apoptogènes dans le cytosol (Hajnóczky et al., 2006; Rasola and Bernardi, 2011).

Les protéines de la famille Bcl-2 ne sont donc pas directement impliquées dans la régulation de l'ouverture du PTP. Cependant, comme nous le verrons dans la partie 1.4, du fait de leur capacité à réguler l'homéostasie calcique au niveau du RE et de la mitochondrie, les protéines Bcl-2 peuvent également contrôler ce mode de perméabilisation de la MME.

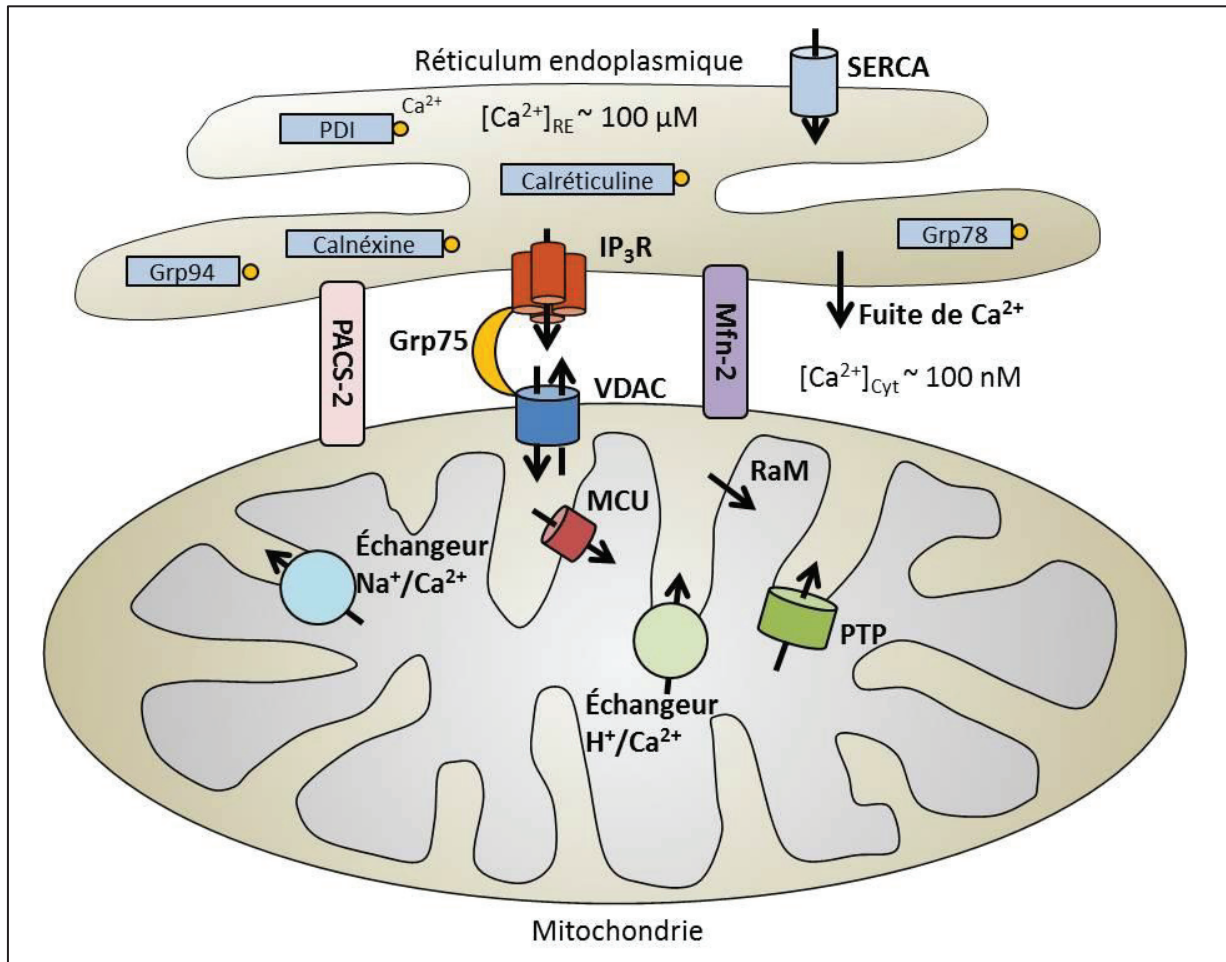


Figure 8 : Homéostasie calcique du RE et de la mitochondrie

Dans le RE, principale réserve de calcium, le calcium est séquestré par différentes protéines dont des chaperonnes et des protéines disulfide isomérases (PDI) impliquées dans le repliement des protéines. Le calcium entre dans le RE par l'action de pompe ATPase SERCA. L'efflux de calcium au RE se fait par des canaux calciques dont l'IP₃R, et par des fuites passives. L'association du RE avec la mitochondrie, via PACS-2, Mfn-2 mais aussi Grp-75 liant l'IP₃R à VDAC, favorise les échanges calciques entre les deux organelles. L'entrée de calcium dans la mitochondrie se fait par VDAC au niveau de la MME puis par MCU ou le RaM au niveau de la membrane interne. L'efflux de calcium est réalisé par les échangeurs Na⁺/Ca²⁺ et H⁺/Ca²⁺ ainsi que par l'ouverture transitoire du PTP.

1.3.3.3.2 Induction de l'apoptose indépendamment du PTP.

En plus de promouvoir l'ouverture du PTP, une augmentation de calcium cytosolique peut également aboutir à l'activation des protéines Bax et Bak. En effet, les calpaïnes, qui sont des protéases à cystéine activées par liaison au calcium, sont capables de cliver différents membres de la famille Bcl-2. Ainsi, Bid peut être clivée en t-Bid par la μ -calpaïne induisant alors l'apoptose de façon dépendante de Bax (Chen et al., 2001). De plus, Bcl-2, Bcl-xL et Bfl-1 sont également clivées par la μ -calpaïne. Ce clivage diminue l'activité anti-apoptotique de Bcl-xL et convertit Bcl-2 et Bfl-1 en protéines pro-apoptotiques capables d'induire le relargage de cytochrome indépendamment de Bax (Gil-Parrado et al., 2002; Valero et al., 2012). Bax semble également clivée par la μ -calpaïne aboutissant à une forme constitutivement active de Bax ne pouvant plus être inhibée par Bcl-2 (Gao and Dou, 2000).

Une augmentation de la concentration cytosolique de calcium peut aussi induire l'activation de Bad. En conditions physiologiques, Bad est phosphorylée ce qui permet sa séquestration par les protéines 14-3-3 (Datta et al., 2000). Cependant, l'augmentation de calcium dans le cytosol peut par ailleurs activer la calcineurine (ou PP2B), une phosphatase calcium-dépendante, qui déphosphoryle Bad rompant ainsi l'association avec 14-3-3 et lui permettant d'activer Bax (Wang et al., 1999). De façon intéressante, une faible élévation du niveau de calcium semble au contraire activer la CaMKK (Ca^{2+} /Calmodulin dependent protein kinase kinase) qui induit la phosphorylation de Bad par la PKB et promeut donc la survie cellulaire (Yano et al., 1998).

Finalement il faut noter que l'augmentation de calcium dans le cytosol peut également induire l'apoptose de façon indépendante de la mitochondrie via la caspase-12. Cette dernière est une caspase initiatrice qui est localisée au RE (Nakagawa et al., 2000; Yoneda et al., 2001). La caspase-12 peut être clivée par les μ - et m-calpaïnes ce qui entraîne son activation et le clivage successif de caspases effectrices induisant alors l'apoptose sans perméabilisation de la MME (Tan et al., 2006; Martinez et al., 2010).

1.4 Contrôle de l'homéostasie calcique par les Bcl-2

1.4.1 Au niveau du RE

Le concept selon lequel les protéines de la famille Bcl-2 peuvent se localiser au niveau du RE (Krajewski et al., 1993) et contrôler l'apoptose via la régulation de l'homéostasie calcique a émergé il y a 20 ans. Cependant, malgré le nombre croissant d'études sur le sujet,

les mécanismes permettant aux protéines Bcl-2 d'exercer cette fonction restent obscurs et sujet à controverse.

Le RE est l'un des sites majeurs de repliement, de modification et de trafic des protéines mais aussi le principal réservoir de calcium de la cellule. La concentration de calcium au sein du RE est extrêmement élevée comparée à celle dans le cytosol ($\sim 100 \mu\text{M}$ pour le RE contre 50-100 nM pour le cytosol). Dans le RE, le calcium est tamponné en se liant à la calréticuline et à la calséquestrine ainsi qu'à des chaperonnes (calnexine, Grp78, Grp94) ou à des protéines disulfide isomérases dont la liaison au calcium régule l'activité dans le repliement des protéines (Mekahli et al., 2011). La concentration luminale de calcium est régulée par différents mécanismes de capture/libération. Ainsi, l'entrée de calcium dans le RE est réalisée par la pompe SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) qui permet le passage du calcium du cytosol vers la lumière du RE de façon ATP-dépendante. L'entrée de calcium est compensée par deux voies de sortie : les canaux calciques et la fuite passive de calcium. Les canaux calciques du RE sont les récepteurs à la ryanodine (RyR) et à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃R). Ces canaux ne sont ouverts que lorsqu'ils sont activés et permettent la génération de signaux calciques qui sont intégrés dans le cytosol pour induire une réponse cellulaire dépendante de l'amplitude et de la fréquence de ces signaux. En plus des canaux calciques il semble qu'il se produise une fuite de calcium au niveau du RE. Différents candidats, comme les translocons (Van Coppenolle et al., 2004) ou les présenilines (Tu et al., 2006) ont été proposés pour exercer cette fonction mais le mécanisme permettant la fuite passive n'est pas complètement compris (**Figure 8**).

1.4.1.1 Régulation par les membres anti-apoptotiques

La première observation suggérant un rôle pour Bcl-2 dans l'homéostasie calcique date de 1993 (Baffy et al., 1993). Les auteurs ont démontré que dans des cellules hématopoïétiques dépendantes de l'IL-3, le retrait d'IL-3 induit l'apoptose par un transfert de calcium du RE vers la mitochondrie. Dans ce modèle, la surexpression de Bcl-2 prévient l'apoptose et bloque ce transfert de calcium. De plus, les auteurs ont observé que la quantité de calcium présente dans le RE n'est pas altérée par la surexpression de Bcl-2 suggérant que cette dernière agit sur la sortie du calcium du RE. L'année suivante deux autres études sont arrivées à la même conclusion. La première a montré que Bcl-2 prévient l'augmentation de calcium dans le cytosol induite par le retrait de sérum sur des cellules NIH3T3 (Magnelli et al., 1994). La seconde a rapporté que Bcl-2 inhibe l'apoptose induite par la thapsigargine, un inhibiteur de la pompe SERCA (Lam et al., 1994). Dans cette dernière étude, Bcl-2 réduit l'efflux de calcium

depuis le RE sans altérer la quantité de calcium dans la lumière du RE. Un effet similaire de Bcl-2 fut également observé après le traitement de cellules par l' H_2O_2 suggérant que Bcl-2 est capable de réduire la sortie de calcium depuis le RE pour prévenir l'apoptose induite par différents stress (Distelhorst et al., 1996; Ichimiya et al., 1998). Cependant d'autres études ont suggéré que Bcl-2 est capable d'augmenter la recapture du calcium par le RE ainsi que la concentration luminale de calcium. He et collaborateurs ont montré que la surexpression de Bcl-2 maintient le stock calcique du RE quand SERCA est inhibée ou quand la concentration extracellulaire de calcium est réduite (He et al., 1997). Bcl-2 n'étant pas capable de prévenir l'inhibition de SERCA dans cette étude, les auteurs ont donc conclu que Bcl-2 pourrait directement stimuler la recapture de calcium par le RE. D'autres études ont également montré que la surexpression de Bcl-2 augmente la quantité de calcium dans le RE bien qu'ici cela provienne d'une expression accrue de SERCA (Kuo et al., 1998; Zhu et al., 1999). Cependant, Kuo et collaborateurs ont tout de même observé une interaction entre Bcl-2 et SERCA qui pourrait favoriser l'activité de cette pompe calcique. Cette interaction a aussi été suggérée dans l'ovocyte de xénope où Bcl-2 désensibilise SERCA à la thapsigargine grâce à son domaine BH4 (Kobrinisky and Kirchberger, 2001). Ainsi, toutes ces études suggèrent que Bcl-2 agit en diminuant la quantité de calcium dans le cytosol soit en réduisant la sortie de calcium du RE soit en augmentant sa recapture ce qui protégerait la mitochondrie d'une surcharge de calcium (**Figure 9A**).

Un autre mécanisme d'action pour Bcl-2 a émergé en 2000 quand deux groupes ont montré que Bcl-2 pouvait au contraire réduire la quantité de calcium dans le RE (Foyouzi-Youssefi et al., 2000; Pinton et al., 2000). Ces deux groupes ont démontré que la surexpression de Bcl-2 réduit la sortie de calcium à travers le canal IP_3R du fait d'une diminution de la quantité de calcium dans le RE consécutive à l'augmentation des fuites passives de calcium à travers la membrane du RE (Foyouzi-Youssefi et al., 2000; Pinton et al., 2000). Dans ces deux études les auteurs attribuent cet effet de Bcl-2 à sa capacité à former des canaux ioniques ce qui permettrait la fuite du calcium luminal. Cette hypothèse est cependant mise à mal par le fait qu'une protéine Bcl-2 chimère contenant le domaine de formation de pore de Bax a le même effet que Bcl-2 sur l'homéostasie calcique du RE (Chami et al., 2004). Il a aussi été montré que Bcl-2 peut réduire l'expression de SERCA et de la Calréticuline pour diminuer la quantité de calcium dans le RE (Vanden Abeele et al., 2002). Une autre étude suggère que Bcl-2 pourrait interagir avec SERCA et la déstabiliser (Dremina et al., 2004). Finalement, une dernière étude a proposé que l'interaction de Bcl-2 avec les protéines à BH3-seulement est requise pour la réduction du stock de calcium du RE (Bassik et

al., 2004). En effet, il semble qu'une forme non phosphorylable de Bcl-2 soit plus efficace que la protéine sauvage à cet égard et ces auteurs ont montré que la phosphorylation de Bcl-2 modifie son interaction avec les protéines à BH3-seulement perturbant alors son effet sur la trafic du calcium réticulaire. Le mécanisme permettant au complexe Bcl-2/BH3-seulement de diminuer la quantité de calcium dans le RE n'est toutefois pas décrit. Dans leur ensemble ces études suggèrent qu'en diminuant le stock de calcium du RE, Bcl-2 prévient une sortie massive de calcium lors d'un stress, protégeant ainsi la mitochondrie d'une surcharge calcique (**Figure 9B**). L'augmentation des fuites de calcium pourrait aussi avoir un effet pro-survie en favorisant le métabolisme mitochondrial ou encore en induisant la phosphorylation de Bad par la CaMKKII. Cependant le mécanisme permettant à Bcl-2 d'exercer une telle fonction n'est pas clairement établi.

Enfin, il a été proposé que Bcl-2 et Bcl-xL interagissent directement avec l'IP₃R pour moduler son activité bien que leur site d'interaction sur le récepteur et leur mécanisme d'action soient différents (Voir partie 2.5.5.6 pour plus de détails). Ainsi, Bcl-2 semble inhiber la sortie de calcium par l'IP₃R de façon dépendante de son domaine BH4 (Chen et al., 2004; Hanson et al., 2008; Rong et al., 2008). De plus, le domaine BH4 de Bcl-2 à lui seul est capable de réguler le canal calcique (**Figure 9A**) (Rong et al., 2009). Bcl-xL semble quant à lui exercer un effet pro-survie en rendant l'IP₃R plus sensible à de faibles concentrations du ligand endogène IP₃ ce qui augmenterait les oscillations de calcium dans le cytosol et activerait le métabolisme mitochondrial (**Figure 9C**) (White et al., 2005; Li et al., 2007).

1.4.1.2 Régulation par les membres pro-apoptotiques.

Les protéines pro-apoptotiques peuvent elles aussi se localiser au RE et jouer sur l'homéostasie calcique. La première observation d'un tel rôle fut réalisée par Pan et collaborateurs qui montrèrent que la surexpression de Bax dans des cellules CHO induit l'apoptose en provoquant une déplétion du calcium luminal (Pan et al., 2001). Il a été montré par la suite que Bax et Bak peuvent se localiser au RE pour induire une sortie massive de calcium provoquant alors le relargage du cytochrome c mitochondrial (Nutt et al., 2002b). Bax semble d'ailleurs requis pour l'induction de l'apoptose calcium-dépendante car les cellules déficientes pour Bax ne présentent pas de réduction du stock de calcium réticulaire en réponse à la staurosporine contrairement aux cellules contrôle (Nutt et al., 2002a). De plus, il semble que lors d'un stress du RE, Bax et Bak puissent s'oligomériser dans la membrane du RE provoquant alors l'activation de la caspase-12. L'expression ciblée de Bak au RE est d'ailleurs suffisante pour induire la déplétion du stock de calcium du RE et l'activation de la

caspase-12 même en absence de Bax et Bak (Zong et al., 2003). Bak localisée au RE peut également être activée par Bim et Puma et ainsi induire le relargage de cytochrome c en partie en favorisant une sortie massive de calcium du RE (Klee et al., 2009). Ainsi, une fois activées, Bax et Bak pourraient promouvoir la sortie du calcium luminal vers le cytosol. De plus, Bik est également capable de se localiser dans la membrane du RE et d'y induire l'apoptose (Germain et al., 2002). Plus récemment, il a été montré que Bik peut induire la sortie du calcium luminal en favorisant la localisation et l'oligomérisation de Bax et Bak au niveau du RE (**Figure 9A**) (Mathai et al., 2005).

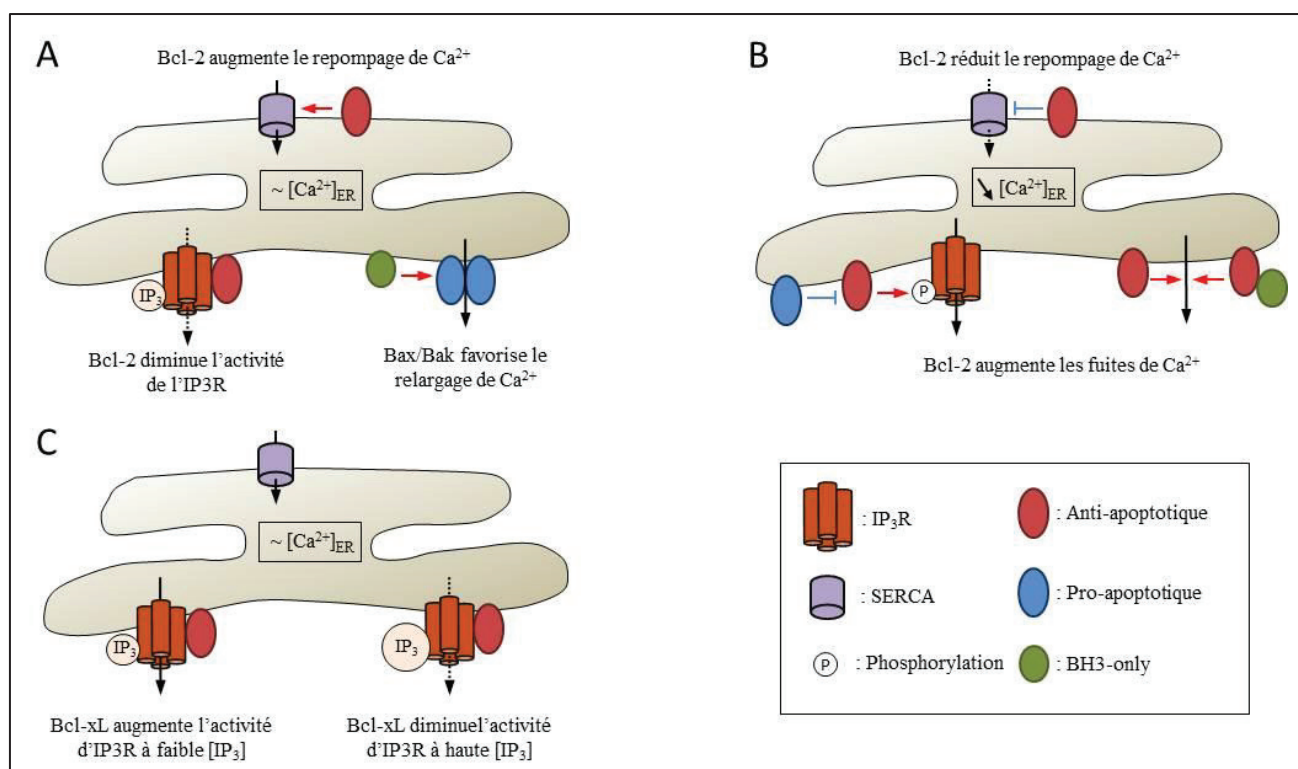


Figure 9 : Contrôle de l'homéostasie calcique par les protéines Bcl-2 au RE

(A) Dans ce modèle, les membres anti-apoptotiques agissent en diminuant la concentration de calcium cytosolique en interagissant soit avec l'IP₃R soit avec SERCA alors que les membres pro-apoptotiques ont l'effet opposé. (B) Dans ce modèle, les membres anti-apoptotiques agissent en diminuant la concentration de calcium dans le RE alors que les pro-apoptotiques contrent cet effet. (C) Dans ce modèle les anti-apoptotiques favorisent la survie cellulaire en augmentant le relargage de calcium vers la mitochondrie

Cependant, des résultats contradictoires existent aussi concernant l'effet des membres pro-apoptotiques sur l'homéostasie calcique du RE. En effet, dans des cellules déficientes

pour Bax et Bak une réduction importante de la quantité de calcium dans le RE a été observée (Scorrano et al., 2003). Ceci suggère que Bax et Bak augmentent le stock de calcium réticulaire ce qui induirait un relargage plus massif de calcium lors d'un stress. Ce groupe a par la suite montré que dans les cellules déficientes pour Bax et Bak, l'IP₃R est en fait hyper-phosphorylé (Oakes et al., 2005). Cet état du récepteur le rendrait plus sensible à de faibles concentrations de ligand, augmentant le relargage de calcium et diminuant ainsi la quantité de calcium dans le RE. Dans ces cellules, l'interaction entre Bcl-2 et l'IP₃R est augmentée et ces auteurs ont montré que l'invalidation de Bcl-2 prévient l'hyper-phosphorylation de l'IP₃R (Oakes et al., 2005). Ainsi, les auteurs suggèrent que Bcl-2 diminuerait le stock de calcium du RE en augmentant la phosphorylation de l'IP₃R alors que Bax et Bak, en interagissant avec Bcl-2, contrediraient cet effet (**Figure 9B**).

1.4.2 Au niveau mitochondrial

Comme indiqué dans la partie 1.3.3.3 la mitochondrie joue un rôle central dans l'homéostasie calcique en « tamponnant » le calcium cytosolique. Dans la mitochondrie, le calcium augmente le taux de production de NADH et l'activité de l'ATP synthase ainsi que celle des déshydrogénases du cycle de Krebs (Gunter et al., 2000). Cependant, une quantité excessive de calcium dans la mitochondrie conduit à l'ouverture du PTP et à l'apoptose. Ayant un rôle avéré dans le contrôle de la mort cellulaire à la mitochondrie, les protéines de la famille Bcl-2 également capables de réguler l'homéostasie calcique mitochondriale. Cependant, comme au niveau du RE, leur rôle au niveau de la mitochondrie ne fait pas l'objet d'un consensus.

La première indication d'un rôle de Bcl-2 dans l'homéostasie calcique mitochondriale a été fournie par une étude portant sur des neurones. Dans ce modèle, la surexpression de Bcl-2 permet aux mitochondries de recapturer plus de calcium sans relargage de cytochrome c suggérant que Bcl-2 protège les mitochondries d'une surcharge calcique (Murphy et al., 1996). Des résultats similaires montrant que Bcl-2 augmente la capacité des mitochondries à stocker du calcium ont été obtenus dans d'autres modèles (Ichimiya et al., 1998; Zhu et al., 1999; Hirata et al., 2012). Cet effet pourrait provenir du fait que Bcl-2 diminue l'activité de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ réduisant ainsi l'efflux de calcium depuis la mitochondrie (Zhu et al., 2001). Cependant, d'autres études ont montré que Bcl-2 n'a pas d'effet sur la recapture du calcium par la mitochondrie (Bassik et al., 2004) ou même qu'elle réduit ce processus (Hanson et al., 2008).

En ce qui concerne les membres pro-apoptotiques seules quelques études suggèrent qu'ils jouent un rôle dans l'homéostasie calcique mitochondriale. Bax peut par exemple favoriser le relargage de cytochrome c induit par le calcium sur des mitochondries isolées suggérant que cette protéine pourrait contribuer à l'entrée de calcium dans la matrice (Gogvadze et al., 2001). Une autre étude a également conclu que Bax et Bak augmentent la concentration de calcium dans la mitochondrie (Nutt et al., 2002b). A l'inverse il a été suggéré que Bax pourrait promouvoir la libération de calcium de la mitochondrie pour induire des vagues de calcium dans la cellule et ainsi amplifier la réponse apoptotique (**Figure 10A**) (Carvalho et al., 2004).

Le mécanisme permettant aux protéines de la famille Bcl-2 de réguler la concentration de calcium dans la mitochondrie n'est pas clairement décrit. Néanmoins, une hypothèse s'appuie sur le fait que ces protéines sont capables d'interagir avec VDAC. Ce canal est la protéine la plus abondante de la MME et il participe activement à l'import du calcium vers l'EIM (Rizzuto et al., 2009). VDAC existe sous deux états, un état ouvert où il est principalement perméable aux anions et aux métabolites et un état fermé où les cations, et en particulier le calcium, peuvent librement passer au travers du canal (Shoshan-Barmatz and Gincel, 2003; Tan and Colombini, 2007). La première étude relatant une interaction entre VDAC et les membres de la famille Bcl-2 a démontré que Bcl-xL, Bax et Bak peuvent interagir avec le canal. Alors que Bcl-xL semble fermer VDAC, Bax et Bak au contraire ouvrirait le canal (Shimizu et al., 1999). La même équipe a ensuite montré que le domaine BH4 de Bcl-2 et Bcl-xL est requis pour que ces protéines exercent leur effet inhibiteur sur l'ouverture de VDAC (Shimizu et al., 2000). Bim pourrait également interagir avec VDAC et favoriser son ouverture (Sugiyama et al., 2002). Finalement, Bcl-xL semble promouvoir la fermeture du canal en interagissant avec le domaine N-terminal de VDAC (Arbel et al., 2012) et une étude récente montre que l'interaction de Bcl-xL avec le canal favorise l'entrée de calcium dans la mitochondrie (Huang et al., 2013). Ainsi, dans ce modèle, les protéines anti-apoptotiques semblent plutôt favoriser l'entrée de calcium dans la mitochondrie alors que les pro-apoptotiques ont l'effet inverse (**Figure 10A**).

Ces résultats sont en désaccord avec une série d'études qui attribue des effets opposés aux membres de la famille Bcl-2 sur l'ouverture de VDAC. Ainsi, il a été montré que Bcl-xL favorise l'ouverture du canal (Vander Heiden et al., 2001) alors que t-Bid pourrait au contraire induire sa fermeture (Rostovtseva et al., 2004). De plus, il a récemment été montré qu'une forme de Bcl-xL ciblée à la mitochondrie protège les cellules contre des stress induisant une augmentation massive de calcium dans le cytosol (Eno et al., 2012). Ceci

suggère que Bcl-xL pourrait empêcher l'entrée de calcium dans la mitochondrie en ouvrant VDAC. Finalement il a été proposé que Bad puisse réguler VDAC pour favoriser l'apoptose dépendante du calcium. En effet, Bad semble capable d'induire l'apoptose indépendamment de Bax et Bak en favorisant l'ouverture du PTP lors d'une augmentation de la concentration de calcium cytosolique (Roy et al., 2009b). Dans ce cas, les auteurs montrent que Bad cible Bcl-xL et réduit son interaction avec VDAC. Ainsi en rompant l'association Bcl-xL/VDAC, Bad pourrait favoriser la fermeture de VDAC et donc l'entrée de calcium dans la mitochondrie (**Figure 10B**).

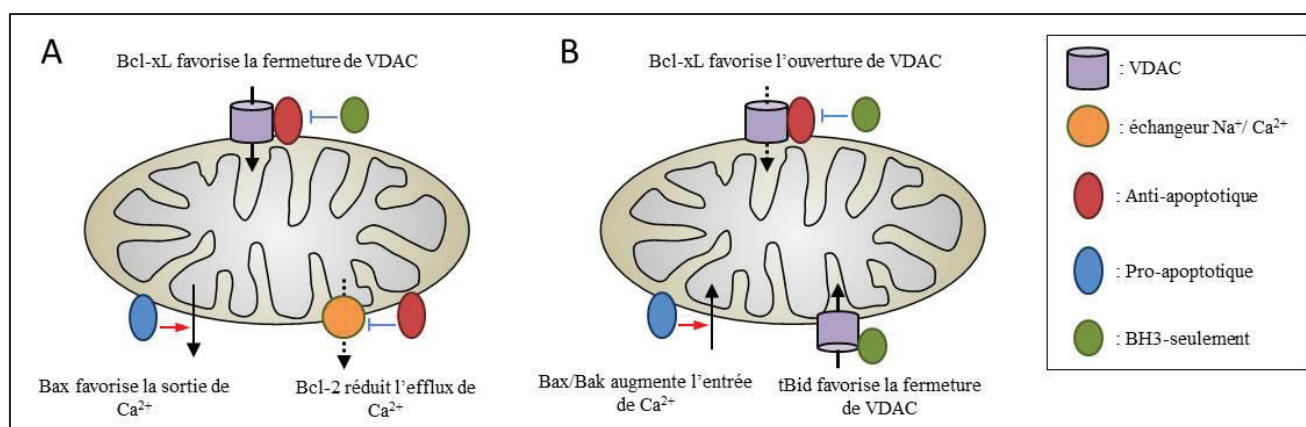


Figure 10 : Contrôle de l'homéostasie calcique mitochondriale par les protéines Bcl-2

(A) Dans ce modèle, les membres anti-apoptotiques augmentent la capacité de la mitochondrie à stocker le calcium alors que les pro-apoptotiques pourraient favoriser le relargage de calcium. (B) Dans ce modèle, les membres anti-apoptotiques agissent en diminuant l'entrée de calcium dans la mitochondrie alors que les pro-apoptotiques ont l'effet opposé.

1.5 Régulation des protéines Bcl-2 par phosphorylation

Étant donné leur rôle dans le destin de la cellule, les protéines de la famille Bcl-2 se doivent d'être finement régulées. Comme nous l'avons vu les interactions entre membres de la famille constituent une part importante de la régulation de l'activité des protéines Bcl-2. Il existe cependant d'autres mécanismes permettant un contrôle fin de l'expression et de l'activité de ces protéines. Ainsi, l'expression des protéines de la famille Bcl-2 est sous la dépendance de nombreux facteurs de transcription qui peuvent être activés ou réprimés selon l'état dans lequel se trouve la cellule. De plus, de nombreux membres de la famille subissent un épissage alternatif qui peut modifier l'activité de la protéine résultante. Enfin, les protéines Bcl-2 sont régulées au niveau post-traductionnel tout particulièrement par phosphorylation.

Dans ce manuscrit nous n'aborderons que ce dernier mécanisme de régulation qui semble jouer un rôle essentielle dans l'activité et la stabilité des protéines Bcl-2.

1.5.1 Régulation des protéines anti-apoptotiques

Parmi les protéines anti-apoptotiques, il est clairement établi que Bcl2, Bcl-xL et Mcl-1 peuvent être régulées par phosphorylation.

Bien que de nombreuses études rapportent une phosphorylation de Bcl-2, l'effet de cette modification post-traductionnelle est toujours sujet à controverse. Les sites de phosphorylation de Bcl-2 sont en revanche bien décrits et il apparait que cette protéine est phosphorylée sur une boucle non-structurée située entre ses domaines BH4 et BH3.

Plusieurs études ont montré que la phosphorylation de Bcl-2 réduit son activité anti-apoptotique. Différentes kinases semblent jouer ce rôle comme Raf-1 (Blagosklonny et al., 1997) ou la PKA qui induit une perte d'interaction entre Bcl-2 et Bax (Srivastava et al., 1998). JNK diminue également l'activité de Bcl-2 en phosphorylant les résidus T69, S70 et S87 dans la boucle non-structurée (Srivastava et al., 1999; Yamamoto et al., 1999). La diminution de l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 par phosphorylation est aussi attribuée entre autres à CDK1 (Pathan et al., 2001; Terrano et al., 2009), mTOR (Asnaghi et al., 2004) ou ERK (Tamura et al., 2004). De façon intéressante, la phosphorylation de Bcl-2 sur les résidus T69, S70 et S87 semblent également contrôler son activité au RE puisqu'un mutant non-phosphorylable est plus efficace que la protéine sauvage pour réduire la sortie de calcium depuis le RE (Bassik et al., 2004).

Cependant, une série d'études suggère au contraire que la phosphorylation de Bcl-2 serait importante pour son activité anti-apoptotique. Ainsi, en phosphorylant le résidu S70 la PKC semble favoriser l'activité de Bcl-2, cet effet étant contré par la phosphatase PP2A en condition de stress (Ito et al., 1997; Ruvolo et al., 1998, 1999). Le même groupe a par la suite montré par des approches de mutagenèse que la phosphorylation coordonnées des résidus T69, S70 et S87 augmente la capacité de Bcl-2 à prévenir l'apoptose induite par différents stress (Deng et al., 2004). Ainsi, dans leur ensemble, ces résultats s'accordent sur une phosphorylation de Bcl-2 sur les résidus T69, S70 et S87 mais l'effet de cette phosphorylation reste encore à être clairement établi.

Bcl-xL est également phosphorylée sur la boucle située entre ses domaines BH4 et BH3. À l'inverse de Bcl-2 toutes les études menées sur la phosphorylation de Bcl-xL s'accordent sur une diminution de l'activité anti-apoptotique de cette protéine. Ainsi, JNK phosphoryle Bcl-xL sur le résidu S62, diminuant son interaction avec Bax (Basu and Halder,

2003; Upreti et al., 2008), et sur le résidu T47 pour favoriser l'apoptose lors d'un stress de l'ADN (Kharbanda et al., 2000). Bcl-xL est également phosphorylée sur les résidus S49 et S62 lors du cycle cellulaire par les Polo Kinases 3 et 1 respectivement (Wang et al., 2011, 2012) suggérant que cette modification post-traductionnelle pourrait jouer un rôle essentiel pour la fonction de Bcl-xL dans le contrôle du cycle cellulaire (Voir partie 1.7.3).

Mcl-1 quant à elle contient, entre les résidus 104 et 175, une région PEST, présente dans les protéines avec une courte durée de vie, et il apparait que la phosphorylation de résidus dans cette région régule la dégradation de Mcl-1. Ainsi, la phosphorylation du résidu T163 par ERK1/2 augmente la durée de vie de Mcl-1 (Domina et al., 2004; Zhao et al., 2009) alors que celle du résidu S159 par GSK3 favorise sa dégradation par le protéasome (Maurer et al., 2006; Zhao et al., 2007). Finalement, la phosphorylation du résidu S162 semble contrôler la stabilité de Mcl-1 mais aussi pour sa localisation ainsi que son activité. En effet la mutation S162A diminue la stabilité de la protéine, abroge la localisation mitochondriale de Mcl-1 et réduit sa capacité à prévenir l'apoptose induite par l'activation de Bak (Thomas et al., 2012).

1.5.2 Régulation des protéines pro-apoptotiques

L'activité pro-apoptotique de Bax semble également régulée par phosphorylation. Ainsi, Akt et la PKC ζ semblent phosphoryler Bax sur le résidu S184 pour l'inactiver en favorisant sa localisation cytosolique et son interaction avec Mcl-1, Bcl-xL et Bfl-1 (Gardai et al., 2004; Xin et al., 2007). Ce résidu est par ailleurs déphosphorylé par PP2A ce qui induit alors un changement conformationnel de Bax favorisant son insertion dans la MME et réduisant son interaction avec Bcl-2 (Xin and Deng, 2006). En revanche, la phosphorylation du résidu S163 par la GSK3 β (Linseman et al., 2004) ou du résidu T187 par JNK et p38 (Kim et al., 2006) induit la relocalisation à la mitochondrie suggérant que Bax peut également être activée par phosphorylation.

Bak est également phosphorylée sur plusieurs résidus (Griffiths et al., 1999) mais longtemps l'effet de ces phosphorylations est resté inconnu. Récemment un modèle suggérant que la déphosphorylation de Bak est impliquée dans son activation a été proposé. Ainsi, lors de l'induction de l'apoptose, le résidu Y108 semble déphosphorylé par la protéine tyrosine phosphatase PTPN5 (Fox et al., 2010). Cette déphosphorylation est nécessaire mais non suffisante pour l'activation et l'oligomérisation de Bak suggérant qu'elle constitue une étape d'initiation à l'activation de la protéine pro-apoptotique (Fox et al., 2010). Par la suite le même groupe a montré que lors d'un stress la protéine phosphatase PP2A déphosphoryle le résidu S117 ce qui permettrait la fixation des protéines à BH3-seulement mais aussi la

dimérisation de Bak (Azad et al., 2012). Cependant, ce modèle est remis en cause par une étude toute récente qui montre que la phosphorylation de Bak est à peine détectable dans plusieurs lignées cellulaires et que cette phosphorylation n'est pas altérée lors de l'apoptose (Tran et al., 2013).

L'activité de la protéine à BH3-seulement Bad est essentiellement régulée par phosphorylation. En effet, il a été montré qu'en présence de facteurs de survie, Bad est phosphorylée sur les résidus S112 et S136 ce qui favorise son interaction avec les protéines 14-3-3 aux dépens de Bcl-xL. (Zha et al., 1996). Il a par la suite été montré qu'Akt phosphoryle le résidu S136 (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997; Blume-Jensen et al., 1998) alors que le résidu S112 est phosphorylé par RSK1 (Bonni et al., 1999; Tan et al., 1999) et la PKA (Harada et al., 1999) entre autres. Ces deux dernières kinases semblent également phosphoryler le résidu S155 pour inhiber l'interaction de Bad avec Bcl-xL (Tan et al., 2000). Ainsi, la phosphorylation conjointe de trois résidus sérines de Bad permet sa séquestration dans le cytosol par 14-3-3 et la perte de son interaction avec Bcl-xL. À l'inverse Bad est activée par déphosphorylation et il a été montré que la calcineurine (Wang et al., 1999) et PP1 α (Ayllón et al., 2000) peuvent jouer ce rôle. Bcl-2 (Ayllón et al., 2001), Bcl-xL et Bcl-w (Ayllón et al., 2002) semblent d'ailleurs favoriser l'association de PP1 α avec Bad.

En revanche, Bad semble également activé par phosphorylation. Ainsi CDK1 peut phosphoryler le résidu S128 induisant une diminution de l'interaction de 14-3-3 avec Bad phosphorylée sur le résidu S136 (Konishi et al., 2002).

Finalement Bad peut être méthylée par la méthyl-transférase PRMT1 sur les résidus R131 et R133 ce qui inhibe la phosphorylation du résidu S136 et favorise donc l'activation de Bad (Sakamaki et al., 2011).

D'autres protéines à BH3-seulement sont régulées par phosphorylation. Ainsi ERK1/2 phosphoryle Bim favorisant sa dégradation par le protéasome (Ley et al., 2003; Luciano et al., 2003) et diminuant sa capacité à interagir avec Bax (Harada et al., 2004), Mcl-1 et Bcl-xL (Ewings et al., 2007). À l'inverse, JNK favorise l'activité pro-apoptique de Bim (Putchá et al., 2003) notamment en réduisant son interaction avec le cytosquelette (Lei and Davis, 2003).

Bid quant à elle est phosphorylée par les Caséine Kinases I et II, ce qui diminue son clivage par la caspase-8 et donc sa capacité à induire l'apoptose (Desagher et al., 2001). Enfin, la phosphorylation de Bik sur ses résidus T33 et S35 augmente son activité pro-apoptotique (Verma et al., 2001) alors que celle de son résidu S124 par ERK1/2 favorise sa dégradation par le protéasome (Lopez et al., 2012). De la même façon, Puma est dégradée suite à la phosphorylation de son résidu S10 (Fricker et al., 2010).

1.6 Implications des protéines Bcl-2 dans le développement et la vie adulte : contribution de la génétique chez la souris

L'apoptose joue un rôle essentiel au cours de la maturation des gamètes et tout au long du développement embryonnaire en contribuant notamment à la formation de différents organes et structures comme le système nerveux ou les doigts (Brill et al., 1999). À ce titre les protéines de la famille Bcl-2 sont impliquées dans l'embryogénèse et l'étude des souris déficientes pour différents membres de la famille a permis d'établir certains rôles spécifiques pour ces protéines dans le développement embryonnaire mais aussi dans la vie adulte.

1.6.1 Membres anti-apoptotiques

Les profils d'expression des membres anti-apoptotiques sont complexes et varient selon le type et le stade de différenciation cellulaire (Hockenbery et al., 1991; Krajewski et al., 1994b, 1995, 1996). L'étude de souris transgéniques, déficientes pour les gènes anti-apoptotiques, a permis de montrer des rôles spécifiques pour ces protéines au cours du développement embryonnaire et dans l'homéostasie de certains types cellulaires.

Les souris déficientes pour Bcl-2 se développent normalement, mais elles sont plus petites que les souris sauvages et la moitié d'entre elles meurt à l'âge de 6 semaines. Cette protéine est essentielle au développement normal du rein, pour la pigmentation des mélanocytes ainsi que pour la survie des lymphocytes T et B (Nakayama et al., 1993, 1994; Veis et al., 1993).

L'inactivation de *bcl-xl* ou de *mcl-1* conduit à la mort des embryons respectivement au 13^{ème} jour de l'embryogénèse ou lors de l'implantation du zygote. Des études basées sur l'inactivation conditionnelle de ces gènes, montrent que Bcl-xL est nécessaire à la survie des cellules immatures au cours du développement neuronal et hématopoïétique (Motoyama et al., 1995; Wagner et al., 2000). D'autre part, Mcl-1 qui est indispensable à l'implantation de l'embryon (Rinkenberger and Horning, 2000), joue un rôle important dans le développement et le maintien du pool des cellules hématopoïétiques (Opferman et al., 2003) ainsi que dans la maturation des neutrophiles, mais pas dans celle des macrophages (Dzhagalov et al., 2007).

Les souris déficientes pour *bcl-w* présentent un développement normal à l'exception des mâles qui sont stériles. En effet, la perte de *bcl-w* conduit à une désorganisation des tubes séminifères associée à une production de spermatozoïdes non matures (Print et al., 1998).

L'invalidation de *Ala*, une des quatre isoformes de Bfl-1/A1 chez la souris, mène à un phénotype quasiment normal à l'exception d'une apoptose spontanée des neutrophiles (Hamasaki et al., 1998).

1.6.2 Membres pro-apoptotiques

Les profils d'expression de Bax et Bak sont relativement ubiquitaires (Krajewski et al., 1994a, 1996). En revanche, Bok semble être exprimée de façon restreinte aux gonades et aux ovaires (Hsu et al., 1997a).

Les modèles de souris transgéniques montrent que l'inactivation de *bax*, n'affecte que partiellement l'apoptose (Knudson et al., 1995) alors que celle de *bak* n'a pas d'effet apparent (Lindsten et al., 2000) suggérant une redondance fonctionnelle pour ces deux protéines. Néanmoins, le double knock-out (DKO) conduit à de nombreux défauts de développement et à la mort périnatale des souris. Seuls 10% des animaux DKO *bax/bak* survivent jusqu'à l'âge adulte, mais ces souris présentent de multiples défauts dans leur développement, dont notamment l'accumulation de cellules excédentaires dans le système hématopoïétique (Lindsten et al., 2000).

Concernant les protéines à BH3-seulement, les souris déficientes pour un gène donné présentent peu d'anomalies phénotypiques suggérant un rôle redondant entre les différents membres BH3-seulement. Le phénotype des souris *bim* *-/-* est le plus marqué avec une perturbation du développement des lymphocytes T, une accumulation de cellules lymphoïdes et myéloïdes et l'apparition de maladies auto-immunes rénales, dues à un défaut d'apoptose (Bouillet et al., 1999, 2002). Les études des souris déficientes pour *nox*, *puma* et *bid* ont montré que les protéines Noxa et Puma jouent un rôle dans l'apoptose induite par la protéine suppresseur de tumeur p53 alors que la protéine Bid est requise pour l'apoptose des hépatocytes induite par le ligand Fas (Yin et al., 1999; Cory and Adams, 2002). Enfin, les souris déficientes pour *bad*, *bik*, *hrk* et *bmf* présentent des phénotypes normaux, ce qui suggère que ces protéines n'ont pas d'effets prédominants ou ont des rôles redondants (Strasser, 2005).

1.7 Rôle non-apoptotiques des protéines de la famille Bcl-2

Tous les phénotypes décrits chez la souris ne peuvent s'expliquer uniquement par des défauts d'apoptose suggérant que les protéines de la famille Bcl-2 pourraient participer à d'autres processus cellulaires. Ainsi, un nombre croissant d'études met en avant des fonctions distinctes de l'apoptose pour les protéines Bcl-2, faisant émerger l'idée que ces dernières sont

en fait des facteurs multitâches dans la cellule. Nous présenterons ici quelques-uns de leurs rôles non-apoptotiques les mieux décrits des protéines Bcl-2.

1.7.1 Métabolisme

Du fait de leur localisation mitochondriale et de leur capacité à réguler l'homéostasie calcique les protéines de la famille Bcl-2 semblent capables d'agir sur le métabolisme glycolytique et oxydatif de la cellule.

Dans un premier temps, il a été montré que Bcl-2, en augmentant la capacité de stockage de calcium de la mitochondrie, accroît le potentiel transmembranaire de la mitochondrie suggérant une augmentation du fonctionnement de la chaîne respiratoire (Zhu et al., 1999). Le même groupe a par la suite montré que l'augmentation de la concentration de calcium dans la matrice mitochondriale lors de la surexpression de Bcl-2 s'accompagne d'une production accrue de NADH et d'une oxydation plus importante du pyruvate (Zhu et al., 2001). Ainsi, ces résultats suggèrent que par sa capacité à réguler l'homéostasie calcique, Bcl-2 favorise le métabolisme oxydatif et donc la production d'ATP dans la mitochondrie.

Plus récemment il a été montré que la surexpression de Bcl-2 augmente la respiration mitochondriale et l'activité de la cytochrome c oxydase (COX) (Chen and Pervaiz, 2007). Ces auteurs ont par la suite démontré que Bcl-2 interagit en fait avec la sous-unité Va de la COX augmentant sa localisation à la mitochondrie (Chen and Pervaiz, 2010). De façon intéressante, de récentes études montrent que Bcl-xL peut se localiser à la membrane mitochondriale interne où elle interagit avec l'ATP synthase FO/F1 (Alavian et al., 2011; Chen et al., 2011). Il semble que Bcl-xL accroît l'activité de l'ATP synthase notamment en augmentant le transport net de protons par FO/F1 (Alavian et al., 2011). Ainsi, Bcl-2 et Bcl-xL pourraient coopérer pour favoriser la respiration mitochondriale et la production d'ATP, l'un en augmentant le transfert d'électrons au niveau de la COX et donc le transfert de protons vers l'EIM, l'autre en favorisant le transport de protons vers la matrice par FO/F1 augmentant ainsi la production d'ATP.

Mcl-1 semble quant à elle essentielle au fonctionnement du métabolisme mitochondrial. En effet, il a été montré que Mcl-1 possède dans sa partie N-terminale une séquence de localisation mitochondriale permettant son import dans la matrice (Perciavalle et al., 2012). L'invalidation de Mcl-1 s'accompagne d'une perturbation de la morphologie mitochondriale mais aussi d'une diminution significative de la consommation d'oxygène et de la production d'ATP qui peuvent être restaurées par la réexpression de Mcl-1 dans la matrice. Ces dysfonctionnements du métabolisme mitochondrial sont dus à une diminution de

l'expression de la sous-unité II de la COX ainsi qu'à une réduction de l'oligomérisation de l'ATP synthase (Perciavalle et al., 2012). Ainsi, Mcl-1 semble jouer un rôle crucial dans la formation de la chaîne respiratoire et il apparaît que ce rôle est bien distinct de son activité anti-apoptotique puisque la forme matricielle n'est en revanche pas capable de prévenir la mort cellulaire.

Finalement, la protéine à BH3-seulement Bad semble aussi à même de réguler le métabolisme énergétique de la cellule. En effet, dans les hépatocytes Bad appartient à un complexe mitochondrial contenant notamment la glucokinase (GK), une isoforme de l'hexokinase principalement exprimée dans les hépatocytes et les îlots β pancréatiques (Danial et al., 2003). L'association de ce complexe à la mitochondrie est dépendante de Bad et la phosphorylation de cette dernière est requise pour son interaction avec la GK. L'invalidation de Bad entraîne une diminution de la respiration mitochondriale en présence de glucose mais aussi une réduction de la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les îlots β et une intolérance au glucose des hépatocytes (Danial et al., 2003, 2008). Ainsi, Bad semble jouer un rôle important dans le métabolisme du glucose et dans le couplage de la glycolyse avec la phosphorylation oxydative. De plus, Bad peut également interagir avec la phosphofructokinase-1 (PFK-1). Cette interaction est indépendante de la phosphorylation de Bad. En revanche la phosphorylation de Bad sur le résidu T201 par JNK augmente l'activité de la PFK-1 et le taux de glycolyse (Deng et al., 2008).

Dans leur ensemble ces résultats suggèrent donc que les protéines de la famille Bcl-2 sont capables de réguler le métabolisme cellulaire en intervenant tant au niveau des premières étapes de la glycolyse qu'à la fin de la phosphorylation oxydative.

1.7.2 Dynamique mitochondriale

La mitochondrie est une organelle dynamique qui se divise et fusionne en permanence. La fusion mitochondriale est sous le contrôle de GTPases : les mitofusines (Mfn) 1 et 2 et Opa1. Mfn 1 et 2 permettent la fusion de la membrane externe alors qu'Opa1 favorise la fusion de la membrane interne. La fission est également régulée par une GTPase, Drp-1 qui est recrutée à la mitochondrie par le biais des protéines Fis1 ou Mff (Westermann, 2010). La dynamique mitochondriale et notamment la fusion semble jouer un rôle dans le déclenchement de l'apoptose puisque Drp-1 semble faciliter l'oligomérisation de Bax et le relargage de cytochrome c (Montessuit et al., 2010). Cependant il apparaît que les protéines de la famille Bcl-2 sont également capables de réguler la dynamique mitochondriale dans des cellules saines. En effet, Bax et Bak semblent requis pour la fusion mitochondriale puisque

l'invalidation de ces deux protéines inhibe considérablement ce processus. Bax semble d'ailleurs directement activer Mfn2 (Karbowski et al., 2006; Hoppins et al., 2011). Bak interagit pour sa part avec Mfn1 et 2 (Brooks et al., 2007). Bcl-xL joue également un rôle dans la dynamique mitochondriale puisqu'elle accélère les processus de fusion et de fission (Berman et al., 2009). De plus, il a été montré que la surexpression de Bcl-xL mais aussi de CED-9, l'homologue de Bcl-2 chez *C. elegans*, augmente la fusion mitochondriale probablement en agissant sur Mfn2 avec laquelle elles interagissent (Delivani et al., 2006; Tan et al., 2008; Rolland et al., 2009). Finalement les protéines à BH3-seulement pourraient aussi être impliquées dans la dynamique mitochondriale. En effet, l'association d'EGL-1, l'unique BH3-seulement de *C. elegans*, avec CED-9 favorise l'interaction de cette dernière avec Drp-1 plutôt qu'avec Mfn-2 induisant alors une augmentation de la fission mitochondriale (Lu et al., 2011).

1.7.3 Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est le processus par lequel les cellules se divisent. Le cycle est divisé en 4 phases : G1, S, G2 (formant ensemble l'interphase) et M, la mitose. Entre la fin de la mitose et la phase G1, les cellules peuvent entrer en quiescence, ou phase G0, où elles arrêtent de se diviser. D'un point de vue moléculaire, le cycle cellulaire est principalement régulé par les cyclines et les CDKs (cyclin-dependent kinases) qui s'associent en différents complexes conduisant les phases du cycle cellulaire.

L'implication des protéines de la famille Bcl-2 dans le cycle cellulaire a été rapidement suggéré après leur découverte puisque la surexpression de Bcl-2, en plus d'inhiber l'apoptose, arrête les cellules en phase G1 (Vaux et al., 1988). Par la suite il a été montré que les cellules déficientes pour Bcl-2 ont un cycle cellulaire accéléré alors que la surexpression de Bcl-2 retarde la transition G0/S. Cet effet est attribué à une augmentation de p27, un inhibiteur des CDK, et à une diminution d'activité du facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T-cells) (Linette et al., 1996). De la même façon Bcl-xL retarde la transition G0/S (Reilly et al., 1996) et il apparaît que les protéines anti-apoptotiques favorisent l'expression de p27 et donc l'inhibition des CDKs requise pour la progression de la phase G1 (Greider et al., 2002). L'effet des anti-apoptotiques sur le cycle cellulaire peut être contré par Bax et Bak (Reilly et al., 1996; Janumyan et al., 2003) et la surexpression de Bax favorise l'entrée en phase S du fait d'une diminution de la quantité de p27 (Brady et al., 1996). Ainsi, les protéines anti et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 semblent exercer un effet opposé sur le cycle cellulaire en régulant le niveau de p27.

Il a été montré que l'action des protéines anti-apoptotiques sur le cycle cellulaire peut être dissociée de leur rôle dans l'apoptose. En effet, la mutation d'un résidu tyrosine conservé dans le domaine BH4 de Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w ne modifie pas leur capacité à se lier aux pro-apoptotiques mais elle abolit en revanche leur effet sur le cycle cellulaire (Huang et al., 1997). De façon intéressante cette mutation perturbe aussi la capacité de Bcl-2 à diminuer le relargage de calcium par l'IP₃R (Monaco et al., 2012b). Par ailleurs, la réduction de la quantité de calcium dans le RE induit un arrêt du cycle cellulaire en G1 dû à une augmentation du niveau de p27 (Chen et al., 1999). Ceci coïncide avec le fait que les cellules déficientes pour Bax et Bak, connues pour avoir un stock de calcium du réticulaire diminué, possèdent une quantité plus importante de p27 et sont plus lentes à entrer en phase S (Janumyan et al., 2008). Ainsi la capacité des protéines de la famille Bcl-2 à réguler les flux calciques depuis le RE pourrait être responsable de leur activité dans le cycle cellulaire. Cette idée est renforcée par le fait que lors du cycle cellulaire la kinase calcium-dépendante CamKII active la voie MEK/ERK qui phosphoryle p27 et induit sa dégradation par le protéasome (Li et al., 2009). Ainsi, les protéines anti-apoptotiques en diminuant la sortie de calcium du RE, soit en inhibant l'IP₃R soit en réduisant le stock de calcium, pourraient prévenir l'activation de la CamKII favorisant la stabilité de p27 et donc l'inhibition des CDK. Les protéines pro-apoptotiques ayant l'effet inverse sur les flux calciques au RE favoriseraient au contraire la dégradation de p27 et accéléreraient alors le cycle cellulaire.

1.7.4 Plasticité neuronale

La plasticité neuronale, ou neuroplasticité, fait référence aux changements de structure, de fonction et d'organisation du réseau de neurones. Ce phénomène se produit au cours du développement du système nerveux mais aussi lors de l'apprentissage ou de la mémorisation. La neuroplasticité est rendue possible par la formation de nouvelles synapses et requiert donc que des neurites s'étendent pour rejoindre le lieu de formation de ces nouvelles synapses.

Bcl-2 est fortement exprimée dans le système nerveux central (SNC) au cours du développement et son expression diminue quand les neurones perdent leur capacité à former des nouveaux axones (Cho et al., 2005). De plus, chez l'adulte alors que l'expression de Bcl-2 diminue dans le SNC, elle reste maintenue dans des structures où la neurogénèse post-natale a lieu comme dans le gyrus denté de l'hippocampe (Merry et al., 1994). Ces résultats suggèrent que Bcl-2 peut jouer un rôle dans la plasticité neuronale et il a effectivement été montré que Bcl-2 favorise la croissance et la régénération des neurites. Ainsi, la surexpression de Bcl-2

dans des neurones du SNC promeut la croissance des axones (Oh et al., 1996) alors que son invalidation conduit à une diminution de l'élongation axonale (Chen et al., 1997; Hilton et al., 1997). De façon intéressante il a été montré que l'effet de Bcl-2 sur l'élongation des neurones dépend de sa localisation au RE où il agit pour favoriser l'activité de ERK et le programme transcriptionnel dépendant de CREB (Jiao et al., 2005). Dans cette étude les auteurs montrent que dans les neurones Bcl-2 réduit la recapture du calcium par le RE, probablement en agissant sur SERCA, induisant alors une augmentation de la concentration cytosolique de calcium (Jiao et al., 2005). L'activation de ERK et de CREB est un élément essentiel de l'extension des neurites et ces protéines peuvent être activées par l'augmentation de la concentration de calcium dans le cytosol via les CaMKs (Waltereit and Weller, 2003). Un autre groupe a également montré que Bcl-2 diminue la recapture du calcium par le RE dans des cellules PC12 (Hirata et al., 2012) suggérant que Bcl-2 agirait dans les neurones du SNC en favorisant une augmentation du calcium cytosolique pour initier le programme transcriptionnel CREB-dépendant. D'ailleurs il a été montré que Bcl-2 et Bcl-xL favorisent l'expression de *c-fos*, un gène cible de CREB nécessaire à l'élongation axonale (Gal et al., 2009). Cependant, une étude sur des neurones du ganglion spiral révèle que dans ce modèle la surexpression de Bcl-2 inhibe la croissance des neurites (Hansen et al., 2006). Ce groupe a par la suite montré que cet effet est observé que Bcl-2 soit localisée à la mitochondrie ou au RE (Renton et al., 2010). Les auteurs proposent que cette différence d'effet de Bcl-2 entre les neurones du SNC et ceux du ganglion spiral puisse venir du fait que chaque type de neurones requiert une concentration de calcium optimale pour l'élongation des neurites (Henley and Poo, 2004). Ainsi, dans les neurones du ganglion spiral, Bcl-2, en agissant à la mitochondrie et au RE, modifierait l'homéostasie calcique de façon à inhiber la croissance des neurites.

Finalement, il est intéressant de noter que la modulation de l'expression de Bcl-2 chez des souris s'accompagne de l'apparition de pathologies où la plasticité neuronale est altérée comme l'anxiété ou les troubles bipolaires (Rondi-Reig et al., 1997; Lien et al., 2008). Par ailleurs un polymorphisme de Bcl-2 modifiant sa capacité à réguler l'IP₃R a pu être mis en évidence chez des patients atteints de troubles bipolaires (Machado-Vieira et al., 2011; Uemura et al., 2011).

1.7.5 Activation des lymphocytes

L'activation des lymphocytes se fait après la fixation d'un antigène sur les récepteurs des cellules T (TCR : T-cell receptor) ou des cellules B (BCR : B-cell receptor). Cette fixation est suivie d'une augmentation de la concentration de calcium cytosolique avec dans un

premier temps un relargage de calcium via l'IP₃R suivi d'une entrée de calcium depuis le milieu extérieur par les canaux CRAC (Calcium-release activated calcium channels) qui sont activés lors du vidage des stocks de calcium intracellulaires (Winslow et al., 2003). Cette augmentation de calcium dans le cytosol permet l'activation de la calcineurine qui va déphosphoryler NFAT induisant son transport dans le noyau et l'initiation d'un programme transcriptionnel nécessaire à l'activation des lymphocytes.

Au-delà de leur fonction de sélection des lymphocytes par apoptose (Rathmell and Thompson, 2002), les protéines de la famille Bcl-2 semblent jouer un rôle dans l'activation des lymphocytes du fait de leur capacité à réguler les flux calciques. En particulier la protéine Bim apparait comme essentielle pour l'activation des lymphocytes T. En effet, les cellules T des souris déficientes pour Bim présentent un défaut d'activation (Ludwinski et al., 2009). Ceci est corrélé à une diminution du relargage de calcium après l'activation du TCR conduisant à une réduction de la déphosphorylation de NFAT. Les auteurs ont montré que l'absence de Bim augmente en fait l'interaction de Bcl-2 avec l'IP₃R. Ainsi, lors de la fixation de l'antigène sur le TCR, Bim serait requis pour rompre l'interaction entre Bcl-2 et l'IP₃R afin de permettre un relargage plus important de calcium depuis le RE.

De plus, il semble que Bax et Bak soient impliquées dans la prolifération des lymphocytes T. En effet, des lymphocytes invalidés pour Bax et Bak prolifèrent beaucoup moins que les lymphocytes contrôles après l'engagement du TCR (Jones et al., 2007). Les auteurs ont observé une diminution du relargage de calcium du RE après l'activation du TCR et cet effet serait dû à une réduction de la quantité de calcium dans le RE dans les cellules déficientes pour Bax et Bak.

1.7.6 Migration et invasion cellulaire

La dérégulation de l'expression des protéines Bcl-2 est souvent associée à la transformation des cellules cancéreuses leur permettant ainsi d'échapper à l'apoptose. Cependant, certaines études montrent que les protéines de la famille Bcl-2 pourraient aussi réguler la migration et l'invasion cellulaire lors de la progression tumorale.

Ainsi, la surexpression de Bcl-2 augmente le potentiel métastatique de cellules de cancer du sein *in vivo* et favorise leur migration et leur invasion *in vitro* (Del Bufalo et al., 1997). Le même effet est observé dans des cellules de gliome et ici la surexpression de Bcl-2 s'accompagne d'une augmentation d'expression des MMP (matrix metalloproteinases) 2 et 9 (Wick et al., 1998). Les MMP sont des enzymes capables de cliver des composants de la matrice extracellulaire et à ce titre elles favorisent la formation de métastase en dégradant la

lame basale (Bauvois, 2012). De la même façon, la surexpression de Bcl-2 dans des cellules de cancer du poumon favorise la formation du complexe de régulation transcriptionnel AP-1 augmentant ainsi l'expression et l'activité de MMP-2 (Choi et al., 2005). Bcl-2 semble également augmenter l'activité du facteur de transcription NF- κ B favorisant l'expression de MMP-9 dans d'autres lignées de cellules cancéreuses (Wang et al., 2007, 2008). Cependant, le mécanisme permettant à Bcl-2 d'activer ces facteurs de transcription n'a pas été décrit.

2 LE RÉCEPTEUR À L'IP₃

Les récepteurs à l'inositol 1,4,5 trisphosphate (IP₃R) constituent avec les récepteurs à ryanodine (RyR) les principaux canaux calciques impliqués dans la libération de calcium depuis les stocks intracellulaires et plus particulièrement du RE.

2.1 Découverte

Au cours des années 60 de nombreuses études ont rapporté une augmentation de la concentration cytosolique de calcium en réponse à différents stimuli extracellulaires (Dikstein et al., 1963; Grodsky and Bennett, 1966; Milner and Hales, 1967; Ozawa and Ebashi, 1967). Cette augmentation fut tout d'abord attribuée à une entrée de calcium depuis le milieu extracellulaire (Rasmussen, 1970). Cependant, l'étude de l'action de la 5-hydroxytryptamine (5-HT) sur la glande salivaire d'insecte a révélé qu'un stimulus extracellulaire peut induire un relargage de calcium depuis les stocks intracellulaires (Prince et al., 1972). Quelques années plus tard, Michell fit remarquer dans une revue que de nombreux récepteurs décrits pour induire une augmentation de calcium cytosolique étaient également décrits comme activant l'hydrolyse des phosphatidylinositols (Michell, 1975). Cette observation permit par la suite d'établir que ces récepteurs favorisaient la synthèse d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) et que ce produit était responsable de la libération du calcium des stocks intracellulaires et plus particulièrement du RE (Berridge, 1983; Streb et al., 1983; Joseph et al., 1984; Prentki et al., 1984, 1985; Volpe et al., 1985; Delfert et al., 1986). Cependant, il restait encore à identifier le mécanisme permettant à l'IP₃ de mobiliser le calcium.

Il fut tout d'abord établi que l'IP₃ est capable de se lier à un récepteur dans la cellule (Spät et al., 1986) mais également qu'il active un canal calcique au niveau du réticulum sarcoplasmique de muscle lisse aortique (Ehrlich and Watras, 1988). L'identité moléculaire de ce canal calcique liant l'IP₃ fut finalement découverte en 1989 lorsque l'équipe de K. Mikoshiba clona l'ADNc codant pour la protéine P400 (Furuichi et al., 1989). Cette protéine fut initialement décrite comme une protéine caractéristique des cellules de Purkinje du cortex cérébelleux puisqu'elle est absente chez les souris mutantes *staggerer* présentant une dégénérescence des cellules de Purkinje (Mikoshiba et al., 1979). L'idée que P400 puisse être le récepteur à l'IP₃ émergea suite à l'observation d'absence de signaux calciques dans les cellules de Purkinje des souris *staggerer* (Crepel et al., 1984). Par la suite, le clonage de *p400* et la caractérisation de la protéine associée permirent d'identifier chez cette dernière une

activité de liaison de l'IP₃, une région transmembranaire en C-terminal et une structure secondaire prédite proche de celle du récepteur à la ryanodine déjà connu pour transporter le calcium (Furuichi et al., 1989; Mignery et al., 1989). Des immuno-marquages établirent ensuite que P400/IP₃R est localisée au RE (Otsu et al., 1990; Satoh et al., 1990). Finalement, il fut montré que la protéine purifiée agit comme un canal calcique en liposome (Ferris et al., 1990) ou en bicouche lipidique (Maeda et al., 1991) alors que la surexpression de P400/IP₃R en cellules augmente l'activité de liaison à l'IP₃ et le relargage de calcium du RE (Miyawaki et al., 1990).

Par la suite, deux autres isoformes de l'IP₃R furent caractérisées (Südhof et al., 1991; Blondel et al., 1993). Les récepteurs à l'IP₃ sont ainsi de grosses protéines de 2749, 2701 et 2670 acides aminés pour les isoformes murines 1, 2 et 3 respectivement. L'IP₃R2 partage 69% d'homologie avec l'IP₃R1 et 64% avec l'IP₃R3 alors que ce dernier possède 62% d'homologie avec l'IP₃R1 (Südhof et al., 1991; Blondel et al., 1993). Les trois isoformes sont exprimées dans tous les tissus bien qu'une isoforme puisse être prépondérante dans certains types cellulaires. C'est notamment le cas dans le système nerveux central où l'IP₃R1 et 3 sont retrouvés dans les neurones alors que l'IP₃R2 est exprimé exclusivement dans les cellules gliales (Vermassen et al., 2004b).

L'IP₃R1 possède de plus trois variants d'épissage. La première région d'épissage S1 se situe entre les résidus 318 et 332. La deuxième région S2 est comprise entre les résidus 1693 et 1731 et la troisième région S3 entre les résidus 918 et 926. L'IP₃R2 possède pour sa part un site d'épissage entre les résidus 176 et 208 alors qu'aucun variant n'a été décrit pour l'IP₃R3 (Foskett et al., 2007).

2.2 Signalisation calcique dépendante de l'IP₃R

L'IP₃R est donc un canal calcique qui est activé en réponse à la synthèse d'IP₃ dans la cellule. La synthèse d'IP₃ est sous la dépendance de la phospholipase C (PLC) qui catalyse la transformation du lipide membranaire phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en IP₃, qui diffuse dans le cytosol, et en diacylglycérol (DAG), qui reste ancré à la membrane plasmique. La PLC est activée par de nombreux stimuli et principalement par la fixation d'un ligand sur les récepteurs couplés aux protéines G ou les récepteurs tyrosine kinase (**Figure 11**). La quantité d'IP₃ produite dépend ainsi de la quantité d'agoniste fixé sur les récepteurs membranaires ce qui va influencer sur la signalisation calcique et donc sur la réponse cellulaire mise en place. En effet, la fixation de l'IP₃ sur l'IP₃R se traduit par une augmentation de la concentration cytosolique de calcium mais celle-ci peut varier en amplitude et en fréquence

selon la force du stimulus extracellulaire. Ceci, allié aux différences de distribution et de quantité des protéines liant le calcium et servant d'effecteur au signal calcique selon les cellules, permet la mise en place d'un large éventail de réponses cellulaires induites par le calcium.

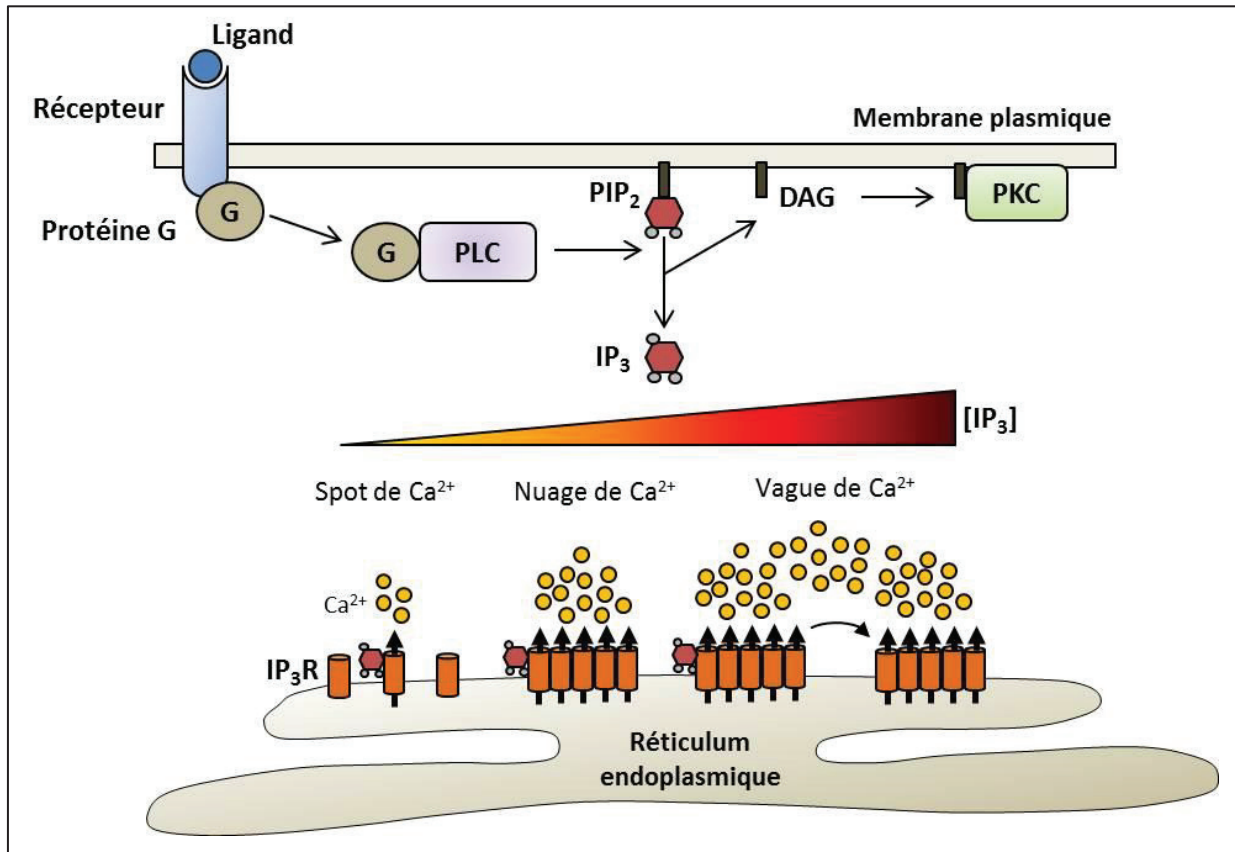


Figure 11 : Signalisation calcique IP₃R-dépendante

La synthèse d'IP₃ est activée après liaison d'un ligand sur un récepteur couplé à la protéine G. Cette dernière active la PLC qui catalyse la transformation du PIP₂ en IP₃ et DAG, qui peut à son tour activer la PKC. Selon la quantité d'IP₃ produite, l'IP₃R va produire différents signaux calciques qui varient en amplitude et en fréquence.

Les signaux calciques induits par l'IP₃ sont donc variés. De faibles quantités d'IP₃ provoquent la génération de « spots » de calcium (**Figure 11**). Ces spots semblent provoqués par l'ouverture de façon aléatoire et autonome de canaux individuels induisant une faible augmentation très localisée de la concentration de calcium durant moins de 140 ms avec une amplitude inférieure à 40 nM. L'augmentation de la concentration d'IP₃ induit la formation de « nuages » de calcium qui sont également assez localisés (6µm) avec une amplitude variant de 50 à 600 nM pour une durée d'environ 1 s. Ces nuages de calcium font intervenir plusieurs

canaux généralement organisés en cluster dans les membranes du RE. L'ouverture coordonnée de ces canaux semble être provoquée par la libération de calcium à travers quelques canaux du cluster ce qui a pour effet d'augmenter la perméabilité des canaux voisins par le phénomène de libération de calcium induit par le calcium (CICR pour calcium-induced calcium release) (**Figure 11**). Une augmentation accrue de la concentration d'IP₃ peut enfin conduire à la formation d'une « vague » de calcium résultant d'une succession de « nuages » de calcium se propageant dans toute la cellule par induction de CICR d'un cluster à l'autre (**Figure 11**) (Berridge et al., 2003; Foskett et al., 2007; Taylor and Tovey, 2010).

2.3 Structure et organisation de l'IP₃R

Les récepteurs à l'IP₃R forment des homo- ou des hétérotetramères dans la membrane du RE (Mignery and Südhof, 1990; Maeda et al., 1991; Joseph et al., 1995a; Monkawa et al., 1995). Chaque monomère est composé de 4 régions principales, chacune jouant un rôle dans le fonctionnement du récepteur : une région N-terminale impliquée dans la fixation du ligand, une partie centrale spécialisée dans la régulation et la transduction du signal, une région transmembranaire permettant le passage du calcium et enfin une région C-terminale impliquée dans l'oligomérisation du récepteur (**Figure 12**). A l'exception du domaine de formation du canal qui est membranaire, tous les autres domaines de l'IP₃R sont localisés du côté cytosolique de la membrane du RE (Michikawa et al., 1994). L'organisation des domaines fonctionnels étant la même pour les trois isoformes, l'IP₃R1 de souris (le mieux caractérisé) sera utilisé comme référence par la suite.

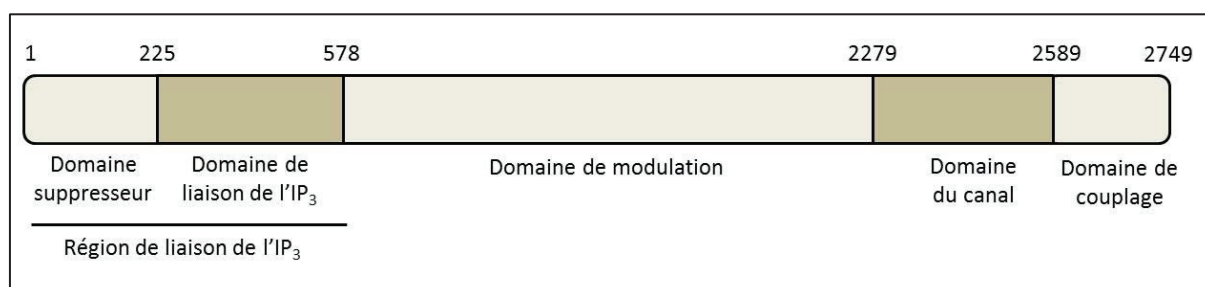


Figure 12 : Organisation fonctionnelle du récepteur à l'IP₃

L'IP₃R est composé de quatre principales régions. La partie N-terminale est impliquée dans la fixation du ligand, la partie centrale dans la régulation de l'activité du canal alors qu'en C-terminal on trouve la région de formation du canal et une région impliquée dans l'oligomérisation du récepteur. L'isoforme 1 murine de l'IP₃R est utilisée comme référence.

2.3.1 La région de liaison de l'IP₃

La partie N-terminale de l'IP₃R1 comprise entre les résidus 1 à 578 est associée à la fixation de l'IP₃ sur son récepteur. Cette région peut toutefois être séparée en deux domaines distincts.

2.3.1.1 Le domaine de liaison de l'IP₃

L'analyse par mutagenèse et délétion de l'IP₃R1 a permis d'identifier la région minimale requise pour la fixation de l'IP₃ entre les résidus 226 à 578 (Yoshikawa et al., 1996, 1999a). Cette région contient de nombreux résidus basiques dont plusieurs sont importants pour la liaison de l'IP₃. En particulier trois d'entre eux, les résidus arginine 265 et 511 et le résidu lysine 508, sont essentiels puisque leur mutation abolit complètement la fixation du ligand sur le récepteur (Yoshikawa et al., 1996). La résolution de la structure cristalline de ce domaine en complexe avec l'IP₃ a ensuite permis de caractériser plus précisément la liaison du ligand avec le récepteur (Bosanac et al., 2002).

Le domaine de liaison de l'IP₃ est composé de deux domaines asymétriques orientés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. Le premier, le domaine β , est composé de brins β organisés en domaine β -trèfle (β -trefoil) alors que le second, le domaine α , est composé d'hélices α adoptant un repliement de type répétition armadillo (**Figure 13A**). À l'interface de ces deux domaines il se crée une poche hautement chargée positivement permettant la fixation de l'IP₃. Dans cette poche, onze acides aminés ont pu être identifiés comme participant à la reconnaissance du ligand. Le groupement 4-phosphate de l'IP₃ interagit principalement avec des résidus du domaine β (les résidus R265, T266, T267, G268, R269 et K569) alors que le groupement 5-phosphate interagit préférentiellement avec des résidus du domaine α (R265, R269, R504, K508, R511 et Y567). En revanche, le groupement 1-phosphate n'interagit qu'avec deux résidus du domaine α (R568 et K569) (**Figure 13B**). Ces résultats concordent avec plusieurs études décrivant un rôle moindre du groupement 1-phosphate dans la fixation de l'IP₃ (Wilcox et al., 1998; Sureshan et al., 2009). Ainsi, l'inositol 4,5-bisphosphate est capable d'induire une sortie de calcium via le canal IP₃R bien que son affinité pour le récepteur soit inférieure à celle de l'IP₃ (Lu et al., 1994). En revanche, ni l'inositol 1,4-bisphosphate ni l'inositol 1,5-bisphosphate ne sont capables d'activer IP₃R (Lu et al., 1994; Bello et al., 2007). À l'exception du résidu G268 tous les autres acides aminés impliqués dans la fixation du ligand sont conservés dans les 3 isoformes de l'IP₃R. L'affinité de l'IP₃ pour ce seul domaine est par ailleurs similaire pour les trois isoformes alors qu'elle diffère pour les

isoformes entières indiquant qu'un autre domaine du récepteur régule la fixation du ligand (Iwai et al., 2007).

En plus de la poche de fixation de l'IP₃, l'étude structurale du domaine de liaison à l'IP₃ a révélé la présence à la surface de ce domaine de 2 régions conservées qui contiennent notamment 2 sites potentiels de fixation de Ca²⁺ (Bosanac et al., 2002). L'un serait formé par les résidus E246, E425, D426 et E248 et l'autre par les résidus E283, E285, D444 et D448 (**Figure 13A**). Ces régions conservées pourraient également servir à l'interaction avec des partenaires ou avec d'autres régions du récepteur comme le domaine suppresseur qui compose la deuxième partie du domaine N-terminale de liaison de l'IP₃.

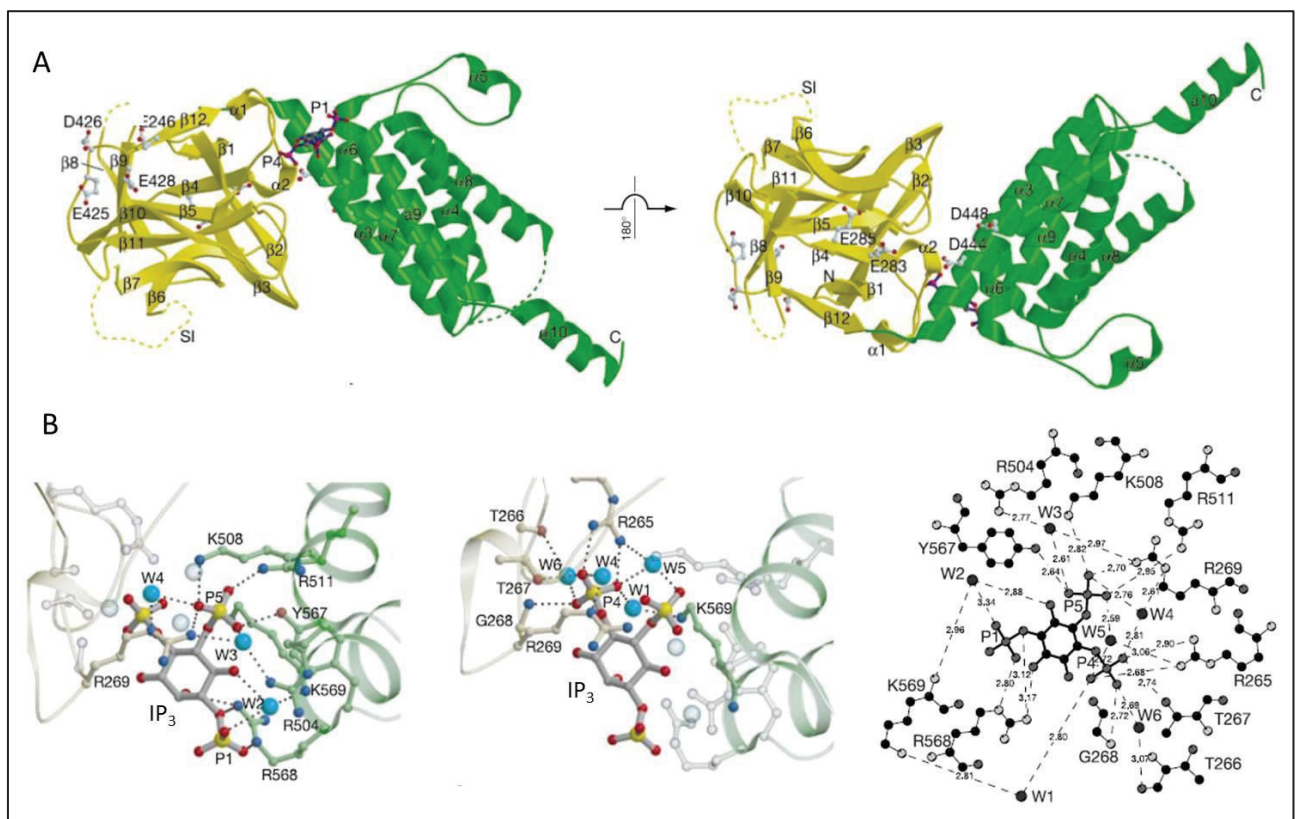


Figure 13 : Représentation 3D du domaine de liaison de l'IP₃

(A) Structure 3D du domaine de liaison obtenue par cristallographie montrant le domaine β organisé en domaine β -trèfle et le domaine α composé d'hélices α adoptant un repliement de type répétition armadillo. (B) Représentation du site de liaison de l'IP₃. Les résidus impliqués dans l'interaction sont indiqués (d'après Bosanac et al., 2002).

2.3.1.2 Le domaine suppresseur

Les 225 premiers acides aminés de l'IP₃R1 jouent un rôle suppresseur pour la fixation de l'IP₃ sur le récepteur puisque la délétion de ce domaine s'accompagne d'une augmentation significative de la liaison de l'IP₃ sur le récepteur (Yoshikawa et al., 1996, 1999a). Ce domaine est par ailleurs responsable de la différence d'affinité pour l'IP₃ des trois isoformes de l'IP₃R. Ainsi alors que le domaine de liaison à l'IP₃ des trois isoformes possède un K_d pour l'IP₃ variant entre 1,5 et 2 nM selon l'isoforme, la présence du domaine suppresseur modifie l'affinité de la région de liaison à l'IP₃ qui affiche alors des K_d de 49,5 nM (IP₃R1), 14 nM (IP₃R2) et 163 nM (IP₃R3). En revanche et de façon surprenante le domaine suppresseur de chaque isoforme n'est pas le seul déterminant de l'affinité d'une isoforme donnée. En effet, des protéines chimères contenant le domaine de liaison à l'IP₃ d'une isoforme fusionné au domaine suppresseur d'une autre isoforme ne possèdent pas la même affinité que la région de liaison à l'IP₃ dont le domaine suppresseur est issu. Ceci indique qu'il existe une coopération entre le domaine suppresseur et le domaine de liaison à l'IP₃ afin de déterminer l'affinité du récepteur pour son ligand (Iwai et al., 2007). Il a d'ailleurs été montré que le domaine suppresseur interagit directement avec le domaine de liaison à l'IP₃ (Bultynck et al., 2004).

La structure cristalline du domaine suppresseur a également pu être déterminée. Le domaine suppresseur est composé d'un domaine structuré en β -trèfle, le domaine « tête », dont émerge, entre les brins β 4 et 5, une structure hélice-boucle-hélice, le domaine « bras » (Bosanac et al., 2005). L'interaction avec le domaine de liaison de l'IP₃ semble être principalement réalisée par le domaine « tête » puisque la délétion du domaine « bras » ne modifie que peu le K_d pour l'IP₃. Sept acides aminés conservés dans les 3 isoformes d'IP₃R ont par ailleurs pu être identifiés comme étant essentiels au rôle suppresseur de ce domaine. Ces résidus (L30, L32, V33, D34, R36, R54 et K127) sont tous situés sur la surface du domaine « tête » (**Figure 14A**) (Bosanac et al., 2005). La résolution de la structure cristalline de l'ensemble du domaine de liaison de l'IP₃ a montré que le domaine suppresseur interagit avec les domaines α et β du domaine de liaison de l'IP₃ sur la face opposée au site de fixation de l'IP₃, formant les interfaces α et β respectivement (Seo et al., 2012). L'interface α est stabilisée par un réseau d'interactions hydrophobes et électrostatiques alors que des interactions hydrophobes et un pont salin stabilisent l'interface β . Les résidus impliqués dans le rôle suppresseur semblent tous appartenir à l'interface α (**Figure 14B**) (Seo et al., 2012).

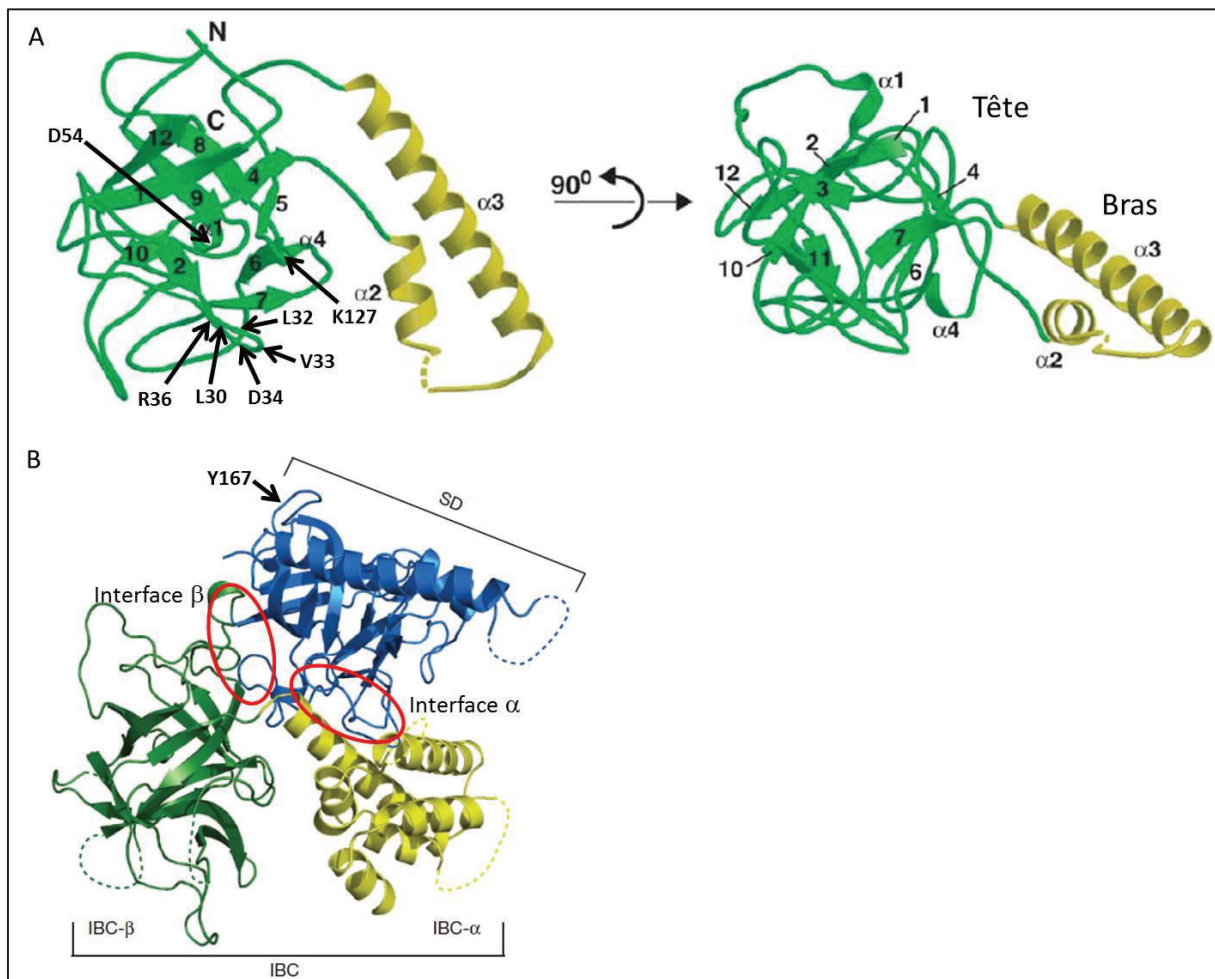


Figure 14 : Représentation 3D du domaine suppresseur

(A) Structure 3D du domaine suppresseur obtenue par cristallographie. Les résidus impliqués dans l'interaction avec le domaine de liaison de l'IP₃ sont indiqués (d'après Bosanac et al., 2005). (B) Structure 3D de la région de liaison de l'IP₃ obtenue par cristallographie. Le résidu Y167 impliqué dans l'ouverture du canal est indiqué (d'après Seo et al., 2012).

De façon intéressante, en plus de son rôle de modulation de l'affinité pour l'IP₃, le domaine suppresseur est également essentiel pour l'ouverture du canal. En effet, la délétion du domaine suppresseur produit un récepteur capable de lier l'IP₃ mais non-fonctionnel (Uchida et al., 2003). Il a par ailleurs été montré que le domaine suppresseur interagit de façon non-covalente avec l'extrémité C-terminale du récepteur (Joseph et al., 1995b; Yoshikawa et al., 1999b). Cette interaction s'effectue via un résidu hydrophobe dans le domaine suppresseur (Y167 pour IP₃R1 et W168 pour IP₃R2/3) et il a été montré que la mutation de ce résidu en alanine abolit l'interaction entre les deux domaines ainsi que le relargage de calcium par le canal (Chan et al., 2010; Yamazaki et al., 2010). Le couplage entre le domaine suppresseur et le domaine canal est donc un élément essentiel du mécanisme

d'ouverture du canal IP₃R. Le résidu Y167 se situe dans une boucle à la surface du domaine suppresseur mais sur la face opposée aux résidus impliqués dans la régulation de l'affinité de l'IP₃ (**Figure 14B**). Il a d'ailleurs été montré que ces deux fonctions sont bien distinctes puisque la mutation des résidus L30, L32, V33, D34, R36, R54 et K127 n'a que peu d'effet sur l'ouverture du canal et inversement la mutation du résidu Y167 n'a pas d'effet sur l'affinité du récepteur pour l'IP₃ (Yamazaki et al., 2010). Finalement, il semble qu'au sein des tétramères le domaine suppresseur d'un monomère interagisse avec le domaine C-terminal d'une autre sous-unité plutôt qu'avec le domaine C-terminal de sa propre sous-unité (Boehning and Joseph, 2000a).

2.3.2 Le domaine de modulation

Le domaine de liaison de l'IP₃ et le domaine de formation du canal sont séparés par une large région de 1700 acides aminés (578-2279). Ce domaine est le lieu de nombreuses interactions avec des partenaires capables de moduler l'activité de l'IP₃R. Cet aspect est développé plus en détails dans la partie 2.5.

En plus de cet aspect de modulation du signal, il semble que cette région du récepteur est également impliquée dans la transduction du signal du domaine de liaison de l'IP₃ à la région canal. En effet, la délétion de la région comprise entre les résidus 651 et 1130 donne un récepteur capable de lier l'IP₃ et possédant un repliement similaire à celui de l'IP₃R sauvage mais ayant perdu son activité de canal calcique (Uchida et al., 2003).

Il existe peu d'informations sur la structure de ce domaine. Cependant, l'analyse de sa séquence suggère la présence d'une haute proportion d'hélices α et d'un repliement en motif de type armadillo dans la continuité du domaine de liaison de l'IP₃ allant du résidu 413 au résidu 1740 (Bosanac et al., 2002). Enfin, des études réalisées par microscopie électronique suggèrent que ce domaine possède une structure globulaire ce qui participerait à donner une forme compacte aux tétramères.

2.3.3 Le domaine de formation du canal

Différentes études ayant pour but d'étudier la topologie de l'IP₃R ont permis d'établir que celui-ci possède 6 domaines transmembranaires localisés dans la région C-terminale du récepteur (Michikawa et al., 1994; Joseph et al., 1997; Galvan et al., 1999). Ces hélices transmembranaires (TM) sont situées entre les résidus 2279 et 2589 et plus précisément entre les résidus : 2279-2294 (TM1), 2308-2326 (TM2), 2352-2372 (TM3), 2391-2407 (TM4), 2240-2462 (TM5) et 2570-2589 (TM6). L'expression ectopique de ce domaine dans des

cellules en culture génère un canal calcique qui n'est cependant plus régulé aboutissant à la déplétion du stock de calcium luminal (Nakayama et al., 2004). Cette région du récepteur semble donc impliquée dans la formation du canal calcique. Il faut cependant noter que les canaux formés par l'IP₃R sont peu sélectifs pour le calcium par rapport aux autres cations divalents et qu'ils peuvent aussi transporter des cations monovalents (Williams et al., 2001). Il semble donc que ce soit la présence d'un fort gradient de calcium entre la lumière du RE et le cytosol comparativement aux autres gradients ioniques existants qui fasse de fait de l'IP₃R un canal calcique.

Les deux premières hélices TM1 et TM2 semblent impliquées dans l'adressage du récepteur au RE puisqu'elles sont suffisantes pour assurer la localisation de l'IP₃R dans ce compartiment (Galvan et al., 1999). Il s'agirait même plus particulièrement d'une séquence d'environ 30 acides aminés, comprenant la fin de l'hélice TM1 et l'hélice TM2, qui permette cet adressage (Pantazaka and Taylor, 2010). Le rôle des hélices TM3 et 4 n'est pas réellement décrit. Cependant, il apparaît que la boucle située entre les hélices TM4 et 5 est essentielle pour l'interaction entre le domaine suppresseur et la partie C-terminale du récepteur ainsi que pour l'activation du récepteur (Schug and Joseph, 2006).

De leur côté, les hélices TM5 et 6 semblent impliquées dans la formation du canal. En effet, la délétion des 4 premières hélices donne un canal possédant une conductivité et une sélectivité comparable à celui du récepteur entier bien que son ouverture ne soit plus régulée par la fixation du ligand (Ramos-Franco et al., 1999). Jusqu'à présent la structure du domaine de formation du canal de l'IP₃R n'a pu être résolue ce qui rend incertain l'organisation des hélices TM permettant la formation d'un pore. Cependant, la topologie et l'organisation du récepteur suggèrent que l'IP₃R appartiendrait, avec le RyR, à une superfamille de canaux ioniques possédant 6 hélices transmembranaires et formant des tétramères. Parmi cette superfamille on retrouverait entre autres le canal à potassium bactérien KcsA dont la structure a été résolue (Doyle et al., 1998). Cette structure a été utilisée pour modéliser le pore formé par l'IP₃R et le RyR. Ainsi sur la base d'homologie de séquence et de prédiction de structure secondaire, d'aire de surface, d'hydrophobicité et de potentiel électrostatique il semble que les hélices TM5 et 6 de l'IP₃R et du RyR adoptent une structure similaire à celles du canal KcsA (Shah and Sowdhamini, 2001; Welch et al., 2004). Ce modèle a d'ailleurs permis de réaliser des simulations de dynamique moléculaire qui rendent bien compte de la perméabilité du RyR (Welch et al., 2004).

Ainsi, dans le cas du canal KcsA chaque monomère fournit 2 hélices TM, proches en séquence des hélices TM5 et 6 de l'IP₃R, qui s'assemblent pour former un canal avec un pore

central au sein du tétramère (**Figure 15**). Ce canal est plus large au niveau de la région d'entrée de l'ion et se resserre vers la sortie. Le pore est formé par la région comprise entre les deux hélices TM grâce à la présence d'une région structurée en hélice α . Cette région comprend également une séquence jouant le rôle de filtre sélectif pour le passage des ions (Doyle et al., 1998).

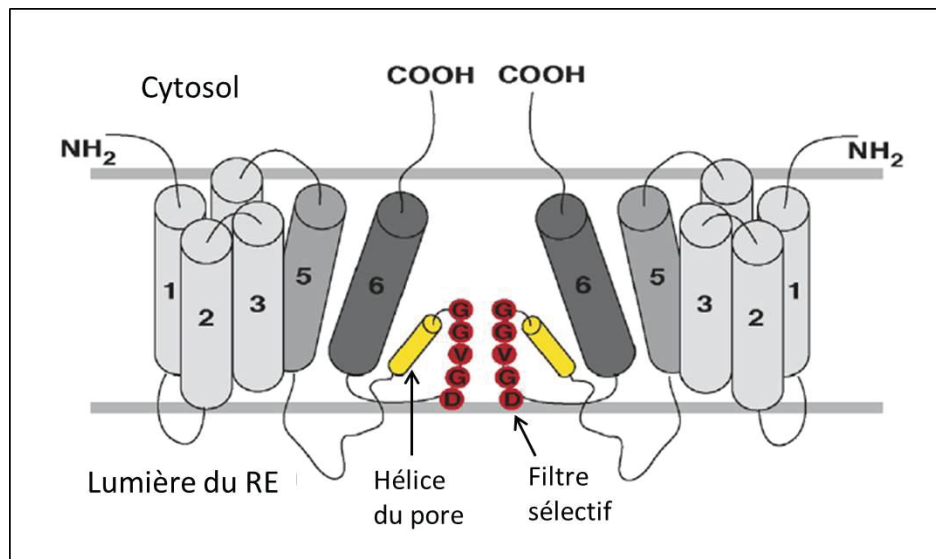


Figure 15 : Représentation schématique du canal de l'IP₃R

Deux sous-unités sont représentées. L'association des hélices $\alpha 5$ et 6 de chaque sous-unité permettrait la formation du canal avec la boucle entre ces deux hélices qui joue un rôle clé grâce à la présence d'une hélice permettant la formation d'un pore et d'un filtre sélectif permettant d'assurer une spécificité relative pour le calcium (d'après Bosanac et al., 2004).

Dans le cas de l'IP₃R, une région de formation de pore a été prédite entre les hélices TM5 et 6 (Michikawa et al., 1994). Cette région est bien conservée dans les 3 isoformes de l'IP₃R et du RyR. De plus une séquence filtre conservée a pu être identifiée (GGGVGD) par homologie avec celle décrite dans le RyR (GGGIGD) (**Figure 15**) (Lynch et al., 1999; Zhao et al., 1999). Il a d'ailleurs été proposé que le résidu valine soit impliqué dans la perméation aux ions monovalents puisque sa mutation en isoleucine augmente la conductivité du canal pour le potassium sans modifier la sélectivité du calcium par rapport au potassium. À l'inverse, le résidu aspartate régulerait la sélectivité au calcium car sa mutation en glutamate rend le canal non-sélectif sans modifier la conductivité de celui-ci (Boehning et al., 2001). De façon intéressante la mutation de cet aspartate en alanine ou en asparagine rend le canal imperméable au calcium (Boehning and Joseph, 2000b). De plus, la mutation en alanine de

résidus dans l'hélice (C2533A et G2541A) ainsi que dans le filtre (G2545A, G2546A, et G2547A) rend le récepteur incapable de s'ouvrir (Schug et al., 2008). Enfin, deux résidus d'isoleucine (I2588 et I2589) situés à l'extrémité de l'hélice TM6 au niveau de l'interface membrane-cytosol semblent également essentiels pour l'ouverture du canal puisque leur mutation en alanine rend le canal inactif (Bhanumathy et al., 2012).

Finalement, l'IP₃R possède une région de 50 acides aminés située dans la lumière du RE entre l'hélice TM5 et le domaine de formation du pore qui n'est pas présente dans le canal KcsA ou le RyR (Michikawa et al., 1994). Cette région est riche en résidus acides suggérant un site de haute affinité pour le calcium (Sienaert et al., 1996) et contient de plus deux sites de glycosylation (Michikawa et al., 1994). Cette région étant absente dans le RyR il est peu probable qu'elle participe à la formation du canal. De plus il a été montré qu'une protéine chimère contenant la partie cytosolique de l'IP₃R et le domaine transmembranaire du RyR est capable d'être activée par l'IP₃ (Seo et al., 2012). Cependant le site de fixation du calcium pourrait jouer un rôle régulateur de l'activité du canal.

2.3.4 Le domaine de couplage

La partie C-terminale du récepteur, composée d'environ 160 acides aminés (résidus 2590 à 2749), est située du côté cytoplasmique de la membrane du RE du fait du nombre pair d'hélices TM de l'IP₃R (Michikawa et al., 1994). Ce domaine semble impliqué dans l'oligomérisation du récepteur en partenariat avec les hélices TM5 et 6. En effet, il a été montré que la présence du domaine transmembranaire et de la partie C-terminale est requise pour la formation de tétramères (Miyawaki et al., 1991; Joseph et al., 1997). En revanche, l'IP₃R amputé de son domaine transmembranaire forme tout de même des dimères (Miyawaki et al., 1991). La région permettant cette dimérisation a été identifiée entre les résidus 2629 et 2654 puisque cette région est capable de se dimériser indépendamment du reste du récepteur (Galvan and Mignery, 2002). Cependant, il a également été montré qu'un mutant de l'IP₃R amputé de son domaine C-terminal, mais contenant les hélices TM5 et 6, est capable de s'associer avec le récepteur sauvage (Galvan et al., 1999). Ces résultats ont permis de proposer un modèle d'oligomérisation dans lequel les hélices TM5 et 6 de deux monomères s'assembleraient lors du transport du récepteur dans la membrane afin de créer des dimères. L'interaction entre domaines C-terminaux au niveau des résidus 2629-2654 permettrait ensuite la formation de tétramères sous la forme de dimères de dimères (Galvan and Mignery, 2002). Cette structure pourrait par ailleurs être stabilisée par la formation d'une structure coiled-coil entre les résidus 2694-2721 de chaque monomère. Cette région, bien conservée

parmi les isoformes de l'IP₃R, semble structurée en hélice α d'après une étude en dichroïsme circulaire et elle est capable de s'assembler en tétramères *in vitro* (Schug and Joseph, 2006). La région 2694-2721 est par ailleurs essentielle au fonctionnement du récepteur puisque la délétion du domaine C-terminal à partir du résidu 2629 rend le récepteur incapable de transporter le calcium (Schug and Joseph, 2006).

Plusieurs résidus critiques ont également pu être identifiés dans le domaine de couplage. Ainsi, deux résidus cystéine (C2610 et C2613) sont essentiels au fonctionnement du récepteur puisque leur mutation en alanine abroge l'ouverture du canal (Uchida et al., 2003). De façon intéressante, ces résidus sont conservés dans les 3 isoformes de l'IP₃R et du RyR suggérant un rôle clé de ces résidus cystéine dans le fonctionnement des canaux calciques. De la même façon la mutation de deux résidus histidine (H2630 et H2635) et d'un résidu arginine (R2596) en alanine abolissent le fonctionnement de l'IP₃R (Bhanumathy et al., 2012).

Finalement, le domaine C-terminal de couplage est capable d'interagir directement avec la boucle située entre les hélices TM4 et 5 (Bhanumathy et al., 2012). Cependant, tous les résidus du domaine de couplage identifiés comme étant essentiels pour l'ouverture du canal ne semblent pas impliqués dans cette interaction. En revanche, le résidu C2613 ainsi que les résidus H2630 et H2635 semblent important pour assurer l'association entre le domaine de liaison de l'IP₃ et la partie C-terminale du récepteur. De façon surprenante la mutation de ces trois résidus affecte également la fixation de l'IP₃ sur le récepteur soulignant la complexité d'organisation du récepteur et l'inter-connectivité existant entre tous les domaines de l'IP₃R (Uchida et al., 2003; Bhanumathy et al., 2012)

2.3.5 Structure quaternaire

Le récepteur à l'IP₃ s'organise en tétramère au sein des membranes du RE. Cependant, sa grande taille (~300 kDa pour chaque sous-unité) ainsi que son insertion dans la membrane représentent des obstacles majeurs à la détermination de la structure 3D du récepteur entier. De plus il est très difficile d'obtenir une grande quantité de protéines recombinantes fonctionnelles et organisées en tétramères ce qui empêche l'utilisation des techniques de cristallographie ou de RMN du solide pour déterminer la structure quaternaire de l'IP₃R. Par conséquent toutes les études portant sur l'organisation des tétramères d'IP₃R ont été réalisées par cryomicroscopie électronique sur des protéines purifiées par immuno-affinité à partir de tissus riches en IP₃R. Grâce à cette approche cinq structures tétramériques différentes ont été proposées au début des années 2000. Toutes ces structures s'accordent sur le fait que le canal comporte 2 régions morphologiquement distinctes, un domaine cytoplasmique et un domaine

canal transmembranaire. De plus il semble que les tétramères possèdent une symétrie d'ordre 4.

Jiang et collaborateurs ont été les premiers à établir une structure quaternaire de l'IP₃R (Jiang et al., 2002). La structure obtenue est compacte et est composée de deux domaines asymétriques, le plus petit représentant la région transmembranaire et le plus gros au-dessus correspondant aux régions cytosoliques. Ce dernier domaine présente 4 protrusions émergeant vers l'extérieur qui pourraient être les domaines de liaison à l'IP₃ (**Figure 16**). Cependant, à l'époque de cette étude la structure 3D du domaine de liaison de l'IP₃ n'ayant pas encore été déterminée, cette hypothèse n'a pu être validée.

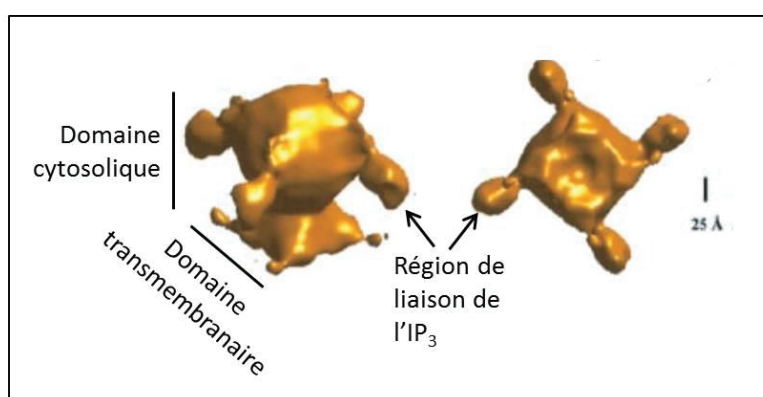


Figure 16 : Représentation 3D de la structure quaternaire de l'IP₃R proposé par Jiang

Structure 3D d'un tétramère d'IP₃R obtenue par cryomicroscopie électronique et observée de côté et de la face luminale. La localisation supposée des différentes régions est indiquée (d'après Jiang et al., 2002).

La structure déterminée par da Fonseca et collaborateurs possède l'aspect d'une « fleur » (da Fonseca et al., 2003). Un petit domaine d'aspect carré et correspondant à la « tige » semble contenir le domaine canal. Au-dessus se situe le domaine cytoplasmique comprenant les « pétales » et le « stigmatte ». De fines connections relient la « tige » aux « pétales » et les « pétales » au « stigmatte ». Dans ce modèle, le domaine de liaison de l'IP₃ est situé dans le « stigmatte » et donc à l'intérieur du tétramère alors que les « pétales » contiendraient le domaine de modulation (**Figure 17**).

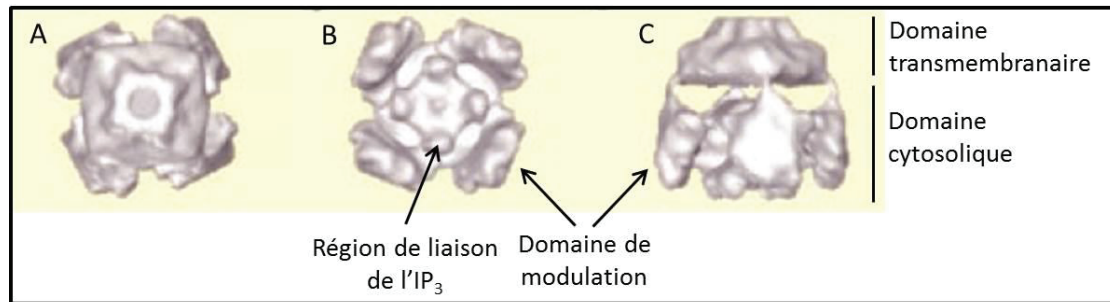


Figure 17 : Représentation 3D de la structure quaternaire de l'IP₃R proposé par da Fonseca

Structure 3D d'un tétramère d'IP₃R obtenue par cryomicroscopie électronique et observée de la face luminale (A), cytosolique (B) et de côté (C). La localisation supposée des différentes régions est indiquée (d'après da Fonseca et al., 2003).

L'étude menée par Sato et collaborateurs propose une structure en forme de « montgolfière » avec le « ballon » contenant le domaine cytosolique et la « nacelle » le domaine canal (Sato et al., 2004). Dans cette structure, les auteurs ont identifié de nombreuses cavités internes dans la région cytosolique ainsi que des structures en forme de L à sa surface. Les auteurs ont pu docker le domaine de liaison dans ces structures en forme de L bien que cela nécessite un changement de conformation du domaine (**Figure 18**).

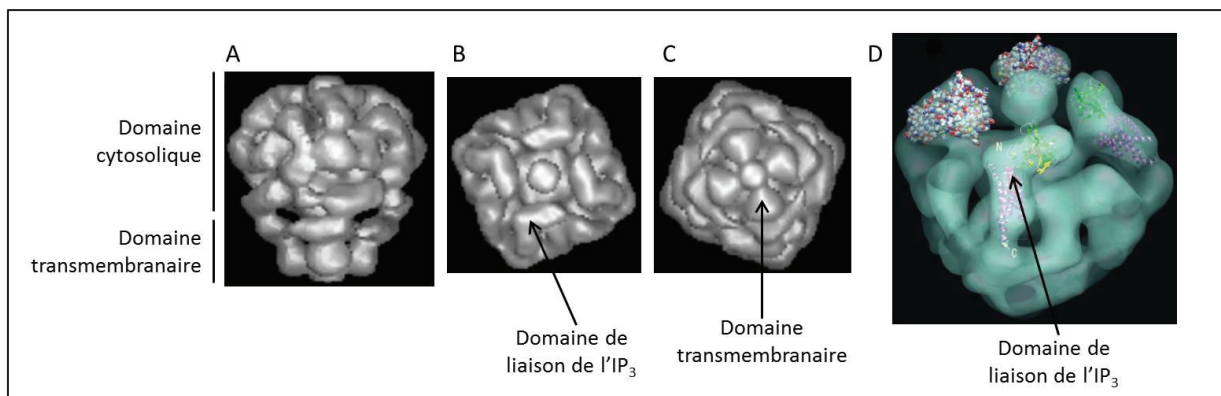


Figure 18 : Représentation 3D de la structure quaternaire de l'IP₃R proposé par Sato

Structure 3D d'un tétramère d'IP₃R obtenue par cryomicroscopie électronique et observée de côté (A), de la face cytosolique (B) et de la face luminale (C). Le docking du domaine de liaison de l'IP₃ est représenté (D). La localisation supposée des différentes régions est indiquée (d'après Sato et al., 2004).

Seryshava et collaborateurs ont déterminé une structure plus large et plus ouverte possédant une forme de moulin avec un domaine central carré et 4 « pointes » incurvées émergentes (Serysheva et al., 2003). La région du canal serait comprise dans un cube au-dessus duquel se situe la région cytosolique. Dans cette étude les auteurs ont « docké » la structure 3D du domaine de liaison de l'IP₃ et en ont déduit qu'il se situerait dans les « pointes » émergentes. Ils ont par ailleurs proposé que le domaine suppresseur soit situé à proximité du domaine de couplage (**Figure 19**).

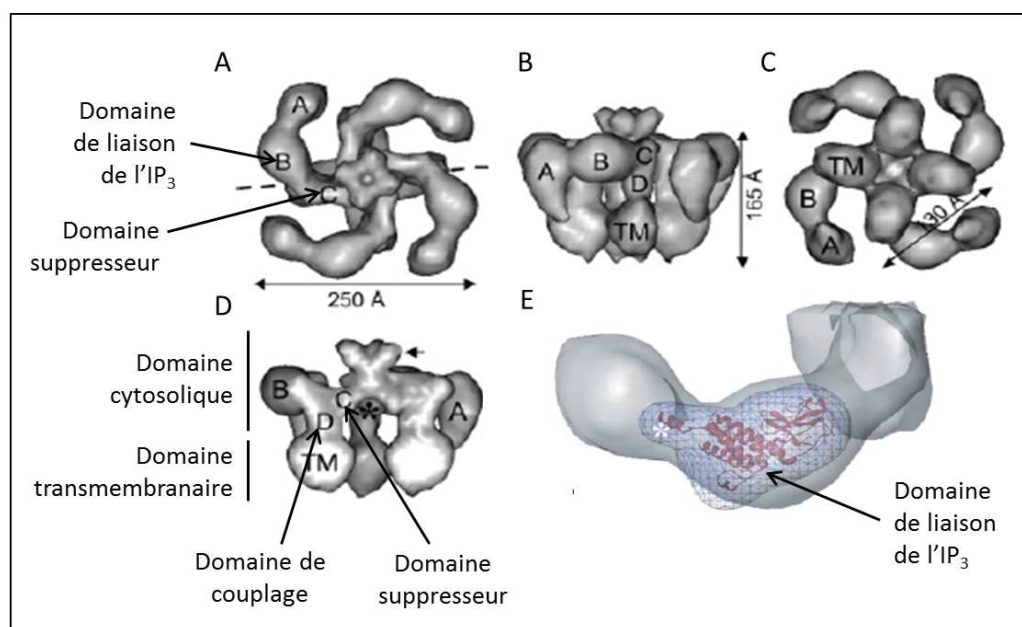


Figure 19 : Représentation 3D de la structure quaternaire de l'IP₃R proposé par Serysheva

Structure 3D d'un tétramère d'IP₃R obtenue par cryomicroscopie électronique et observée de la face cytosolique (A), de côté (B), de la face luminale (C) et en coupe frontale (D). Le docking du domaine de liaison de l'IP₃ est représenté (E). La localisation supposée des différentes régions est indiquée (d'après Serysheva et al., 2003).

Finalement, Hamada et collaborateurs ont déterminé la structure quaternaire de l'IP₃R en absence et en présence de calcium (Hamada et al., 2003). En absence de calcium, l'IP₃R adopterait une conformation « carrée » ayant l'aspect d'un « champignon ». La région cytosolique formée par un large domaine carré est reliée au domaine canal par 4 ponts. En présence de calcium, les auteurs observent un changement de conformation avec le domaine cytosolique qui adopte une forme de moulin avec 4 domaines émergeant du cœur central du tétramère. Le calcium étant un co-activateur de l'IP₃R, les auteurs proposent que ce

changement de conformation corresponde au passage à un état ouvert du canal. Les auteurs suggèrent également que le domaine de liaison de l'IP₃ est situé à la périphérie du « champignon » dans l'état fermé et dans les « hélices » du « moulin » dans la conformation ouverte avec le calcium (**Figure 20**).

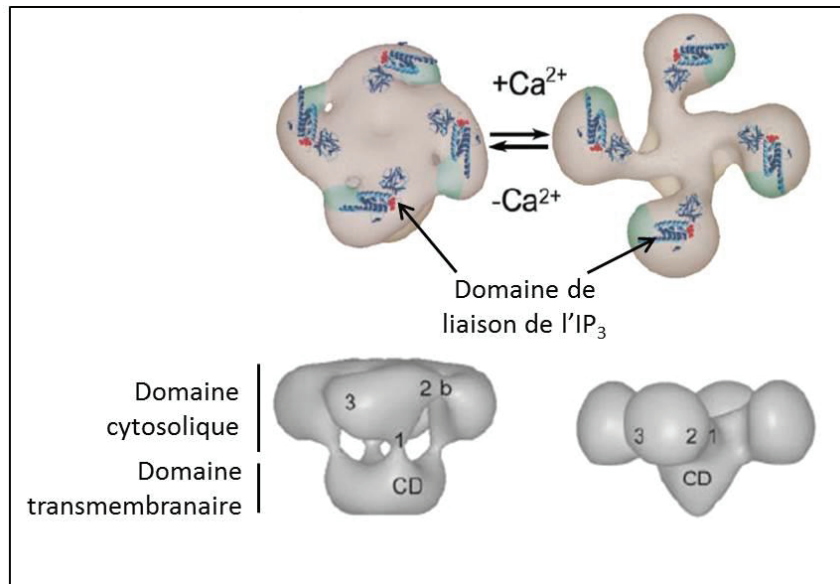


Figure 20 : Représentation 3D de la structure quaternaire de l'IP₃R proposé par Hamada

Structure 3D d'un tétramère d'IP₃R obtenue par cryomicroscopie électronique et observée de la face cytosolique ou de côté. Dans ce modèle la fixation de calcium induit un changement de conformation du tétramère. Le docking du domaine de liaison de l'IP₃ est représenté. La localisation supposée des différentes régions est indiquée (d'après Hamada et al., 2003).

Cependant une étude récente remet en question toutes ces structures puisque les auteurs y affirment que dans les études précédentes le bruit observé en cryomicroscopie électronique est trop important pour obtenir une structure fiable (Ludtke et al., 2011). Grâce à l'amélioration des techniques de microscopie électronique les auteurs ont ainsi pu déterminer une structure quaternaire de l'IP₃R avec une résolution de l'ordre du nm alors que les études précédentes avaient une résolution de 20 à 30 nm. Cette structure a par ailleurs été validée par différentes méthodes informatiques déjà utilisées pour la validation de structures 3D obtenues par cryomicroscopie électronique (Murray et al., 2013). Il apparaît donc que les tétramères d'IP₃R adoptent une forme de « champignon » contenant deux régions de forme carrée connectées entre elles par de fines tiges. Le plus grand domaine correspond à la partie cytosolique tandis que le plus petit comprend le domaine canal. Dans cette structure les

domaines de liaison de l'IP₃ et de formation du canal ne semblent pas directement reliés. Cependant, au niveau du domaine cytosolique, les auteurs observent la présence d'une « prise » semblant relier les quatre sous unités entre elles et plongeant vers la membrane (Figure 21).

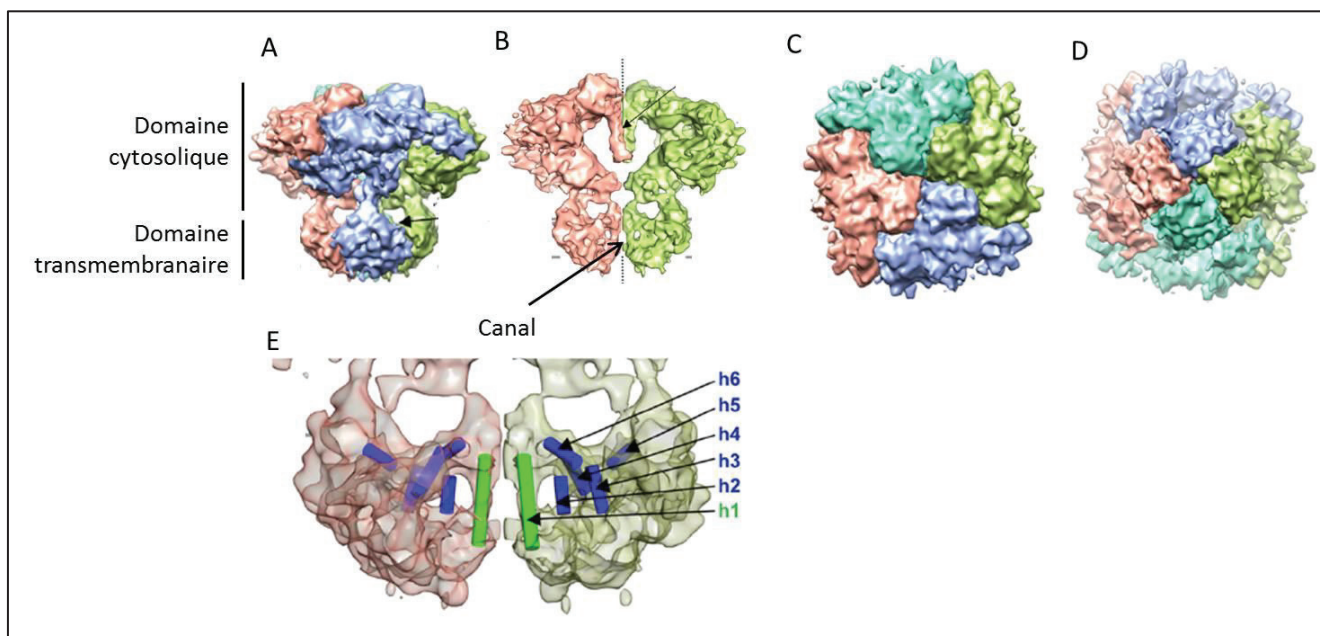


Figure 21 : Représentation 3D de la structure quaternaire de l'IP₃R proposé par Ludtke
Structure 3D d'un tétramère d'IP₃R obtenue par cryomicroscopie électronique et observée de côté (A), en coupe frontale (B), de la face cytosolique (C) et de la face luminale (D). La région du canal est indiquée. Dans ce modèle, les hélices du domaine de formation du canal ont été placées dans le domaine transmembranaire (d'après Ludtke et al., 2011).

2.4 Activation du canal

Le mécanisme d'ouverture du canal n'est à ce jour pas clairement établi. Cependant, les études de mutagenèse ainsi que de récentes avancées dans la modélisation du domaine N-terminal ont permis d'élaborer certaines hypothèses expliquant comment la fixation de l'IP₃ sur le domaine de liaison peut activer l'ouverture du canal situé quelques 2000 acides aminés plus loin.

2.4.1 Fixation de l'IP₃

Une étude récente a permis d'identifier les changements conformationnels du domaine N-terminal de liaison de l'IP₃ induits par la fixation du ligand (Seo et al., 2012). En effet, dans cette étude les auteurs ont résolu la structure 3D du domaine N-terminal, comprenant le

domaine suppresseur et le domaine de liaison de l'IP₃, en absence et en présence d'IP₃ avec une résolution de 3 et 3,6 Å respectivement. La fixation du ligand induit tout d'abord un rapprochement des domaines α et β du domaine de liaison de l'IP₃ avec une réduction d'environ 8° de l'angle entre les deux domaines. Ce résultat confirme donc un mécanisme suggéré auparavant par d'autres études (Chan et al., 2007; Sureshan et al., 2009). De plus, cette étude montre qu'après la fixation du ligand le domaine suppresseur et le domaine de liaison de l'IP₃ restent associés. Alors que les interactions de l'interface α changent très peu, le domaine suppresseur s'éloigne en revanche du domaine de liaison au niveau de l'interface β . L'attachement au niveau de l'interface α amène le domaine suppresseur à effectuer une rotation d'environ 9° ce qui entraîne notamment une translation de la boucle contenant le résidu Y167 (dénommée boucle HS). Ainsi ce résidu se déplace d'environ 3,7 Å ce qui pourrait représenter une étape cruciale dans la transduction du signal vers le pore puisqu'il a été montré que le résidu Y167 est essentiel pour l'ouverture du canal (**Figure 22**) (Chan et al., 2010; Yamazaki et al., 2010).

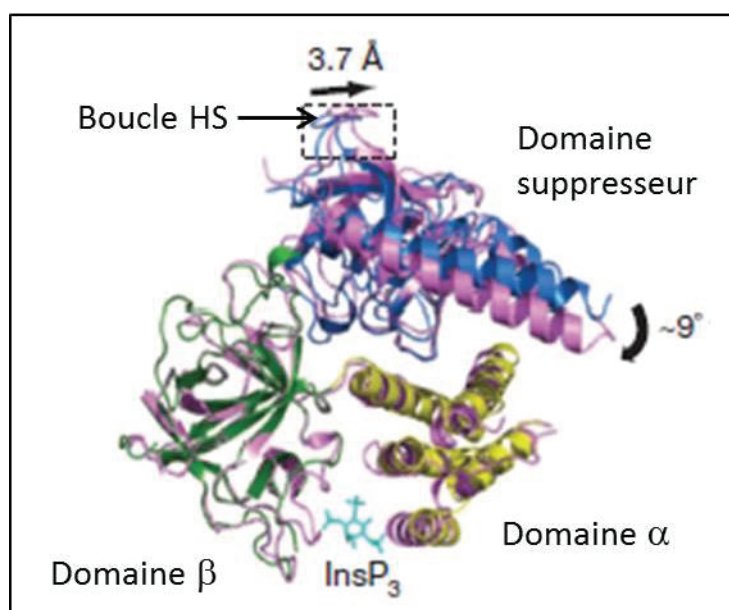


Figure 22 : Changement structural de la région de liaison de l'IP₃ après fixation de l'IP₃
Représentation 3D de la région de liaison de l'IP₃ et des changements structuraux induits par la fixation du ligand. La boucle HS contenant notamment le résidu Y167 est indiquée (d'après (Seo et al., 2012)).

Afin de comprendre comment la fixation de l'IP₃ sur le domaine de liaison peut entraîner l'ouverture du canal, la structure du domaine de liaison de l'IP₃ a été « dockée » dans la structure quaternaire obtenue en 2011 par Ludtke et collaborateurs (Seo et al., 2012). Les résultats obtenus suggèrent qu'en réalité le domaine N-terminal ne semble pas capable d'interagir directement avec le domaine canal comme cela avait été suggéré (Schug and Joseph, 2006). En effet, les domaines de liaison de l'IP₃ se situeraient à la surface de la région cytoplasmique. Cet arrangement permet un accès pour l'IP₃ par le haut du tétramère mais cela place en revanche le domaine de liaison à environ 60 Å de la région transmembranaire. Cependant, les auteurs ont pu observer de façon intéressante que la boucle HS de chaque sous-unité entre en contact avec la région β du domaine de liaison de la sous-unité voisine (**Figure 23**). Ainsi, les auteurs proposent que lors de la fixation du ligand, la réorientation de la boucle HS et la perte d'interaction au niveau de l'interface β conduit également à la perte d'interaction entre sous-unités produisant une réorganisation complète de la partie apicale du récepteur.

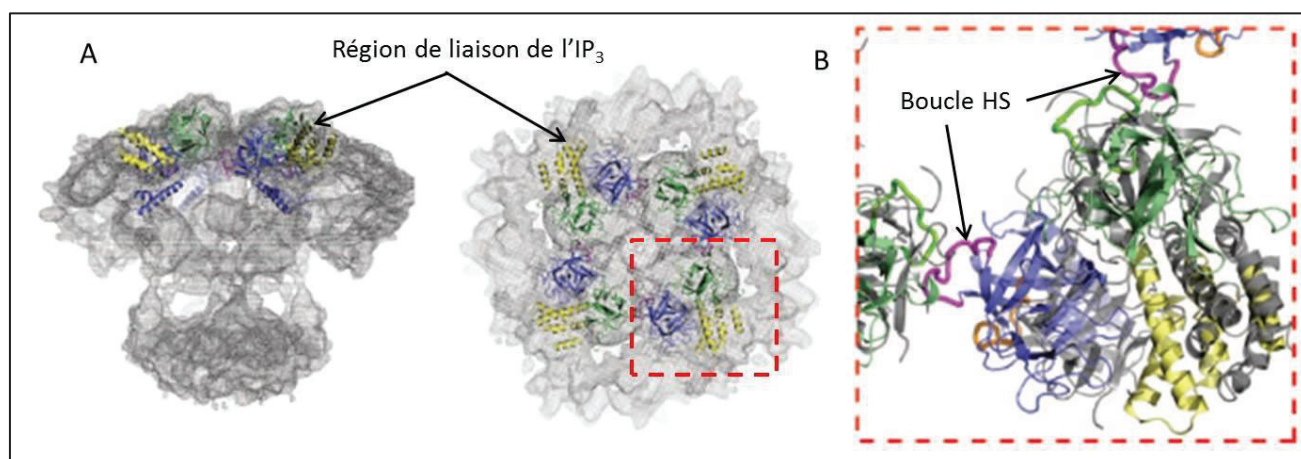


Figure 23 : Docking de la région de liaison de l'IP₃ dans la structure quaternaire de l'IP₃R

(A) Docking de la région de liaison de l'IP₃ dans la structure quaternaire obtenue par Ludtke et collaborateurs. (B) Organisation des domaines N-terminaux des sous-unités du tétramère, la boucle HS est indiquée et semble interagir avec le domaine N-terminal de la sous-unité voisine (d'après Seo et al., 2012).

2.4.2 Ouverture du canal

Ces récentes avancées structurales couplées aux études de mutagénèses abordées dans la partie 2.3 ont permis l'élaboration d'un modèle expliquant comment la fixation de l'IP₃ pourrait induire l'ouverture du canal (Bhanumathy et al., 2012). Ce modèle se base sur l'hypothèse que le domaine de couplage C-terminal se projette tout le long de la partie cytosolique du tétramère dans sa portion centrale. Cette hypothèse est corroborée par une étude portant sur l'accessibilité de résidus cystéine dans ce domaine de l'IP₃R (Anyatonwu et al., 2010). De plus la structure 3D du canal à potassium KcsA révèle que dans ce canal la queue C-terminale se projette vers le cytosol (Uysal et al., 2009). Ceci permettrait également d'expliquer comment le domaine de liaison de l'IP₃ peut interagir avec la partie C-terminale du récepteur (Yoshikawa et al., 1999b; Boehning and Joseph, 2000a) malgré la distance séparant ce premier du domaine transmembranaire. Le domaine de couplage se projetterait donc vers le haut du tétramère établissant alors une liaison avec la partie N-terminale du récepteur (**Figure 24**).

Le domaine de couplage interagit également avec la boucle située entre les domaines TM4 et 5 (Bhanumathy et al., 2012). Le domaine coiled-coil prédit dans le domaine de couplage pourrait donc assurer l'interaction entre les régions N- et C-terminales puisque sa délétion abolit cette association et rend le canal inactif (Schug and Joseph, 2006). Ainsi, le changement conformationnel induit par la fixation de l'IP₃ au niveau du domaine N-terminal pourrait être transmis à la région transmembranaire par le domaine de couplage. Ce dernier modifierait alors la position de la boucle entre les hélices TM4 et 5 ce qui pourrait entraîner l'ouverture du canal formé par les hélices TM5 et 6 (**Figure 24**). Cependant, aucun des résidus identifiés dans le domaine de couplage comme étant essentiel à l'ouverture du canal (C2610, C2613, H2630 et H2635) n'est impliqué dans l'interaction avec la boucle du domaine transmembranaire mais leur mutation diminue tout de même l'association du domaine N-terminal avec la partie C-terminale du récepteur (Bhanumathy et al., 2012).

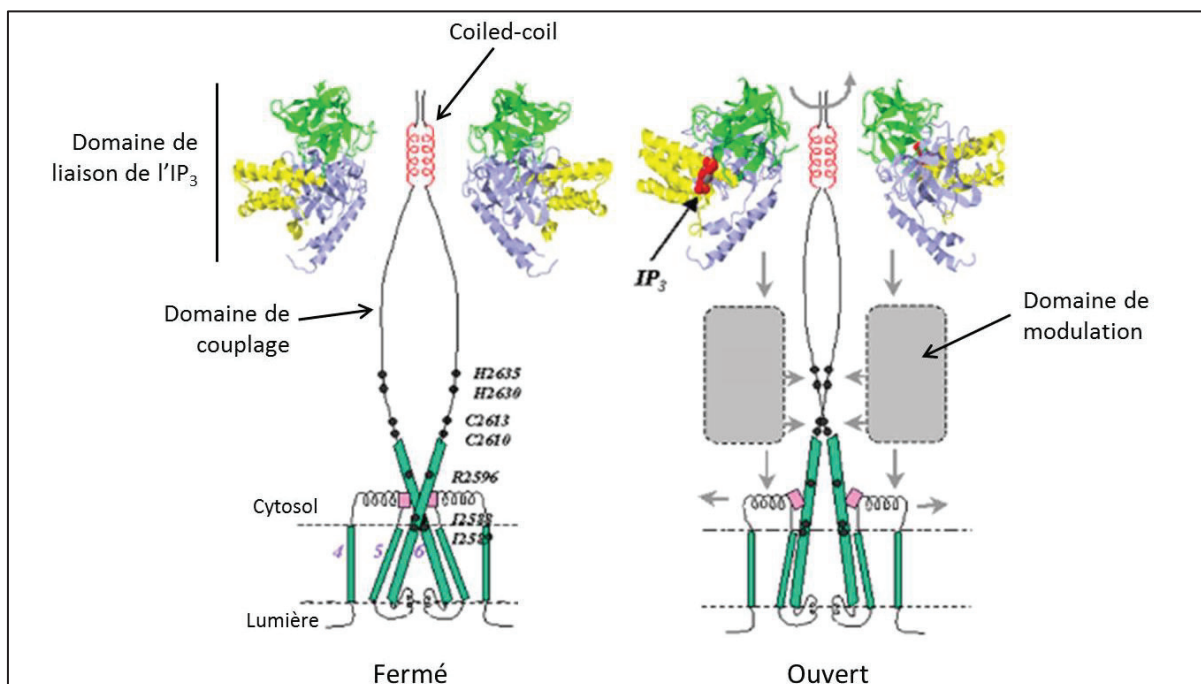


Figure 24 : Modèle d'ouverture du canal

Le domaine de couplage émergerait vers l'intérieur du canal. La fixation de l'IP₃ induirait l'ouverture du canal par la transmission du signal via le domaine de couplage et le domaine de modulation pour induire un changement de conformation des hélices $\alpha 5$ et 6 et donc l'ouverture du canal (d'après Bhanumathy et al., 2012).

Ce mécanisme est en revanche remis en question par le fait qu'une protéine chimère contenant la partie C-terminale du RyR associée au reste de l'IP₃R reste fonctionnelle et activée par l'IP₃ (Seo et al., 2012). En effet, la queue C-terminale du RyR est plus courte et ne possède pas de domaine coiled-coil prédit. L'interaction du domaine de couplage avec le domaine N-terminal ne peut donc pas à elle seule expliquer l'ouverture du canal. Ainsi le domaine central de modulation doit également jouer un rôle essentiel en interagissant par exemple avec les résidus clés du domaine de couplage. Cependant, très peu d'informations existent sur les interactions que ce domaine peut avoir avec le reste du récepteur laissant pour le moment le mécanisme d'ouverture du canal non élucidé.

2.5 Régulation de l'activité de l'IP₃R

Le calcium étant un second messager contrôlant un très large éventail de processus cellulaires, il apparaît essentiel que sa concentration cytosolique soit strictement contrôlée. Ceci passe à priori par une régulation très fine de l'activité de l'IP₃R. Le récepteur est régulé par des interactions avec différentes protéines mais aussi par phosphorylation. Ici, nous ne

présenterons qu'une partie des protéines impliquées dans le contrôle de la perméabilité du canal. L'ensemble des régulateurs décrits dans la littérature est présenté dans le **tableau 2**.

	Régulateur	Fonction	Site d'interaction/ phosphorylation/ clivage	Effet sur l'IP ₃ R	Références
Domaine supresseur	Calmoduline (CaM)	Régulateur Ca ²⁺ -dépendant ou non de l'activité de nombreuses protéines	49-81; 106-128	Diminue la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Hirota et al., 1999b; Michikawa et al., 1999; Missiaen et al., 1999, 2000; Adkins et al., 2000; Sienaert et al., 2002)
	CaMKII	Ser/Thr Kinase dépendante du calcium et de la calmoduline	T150	Diminue la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Yamamoto et al., 1989; Ferris et al., 1991b; Zhu et al., 1996; Bare et al., 2005; Maxwell et al., 2012)
	Homer	Protéine d'échafaudage	49-53	Favorise l'association de l'IP ₃ R avec un récepteur couplé à la protéine G	(Tu et al., 1998)
	RACK1	Protéine de liaison pour la PKC avec certains de ces substrats	90-110	Augmente l'affinité de l'IP ₃ R pour l'IP ₃	(Patterson et al., 2004)
Domaine de liaison de l'IP ₃	CaBP, CIB1	Protéines liant le calcium	?	Diminue la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Yang et al., 2002; Haynes et al., 2004; Kasri et al., 2004b; White et al., 2006; Li et al., 2009, 2013)
	IRBIT	Inhibiteur de la fixation d'IP ₃	Résidus impliqués dans la liaison de l'IP ₃	Inhibition de la liaison de l'IP ₃	(Ando et al., 2003, 2006; Devogelaere et al., 2006)
	ATP	Nucléotide triphosphate	Résidus impliqués dans la liaison de l'IP ₃	Inhibition de la liaison de l'IP ₃	(Maeda et al., 1991; Maes et al., 2000)
	Fyn	Tyrosine Kinase	Y353	Sensibilise l'IP ₃ R à l'IP ₃ et diminue l'inhibition par le calcium	(Jayaraman et al., 1996; Cui et al., 2004; deSouza et al., 2007)
	CDK1	Ser/Thr Kinase	S421	Sensibilise l'IP ₃ R à l'IP ₃	(Malathi et al., 2003, 2005; Sun et al., 2009)
	ERK1/2	Ser/Thr Kinase	S436	Sensibilise l'IP ₃ R à l'IP ₃	(Bai et al., 2006; Lee et al., 2006; Sun et al., 2009)

Domaine de modulation	RACK1	Protéine de liaison pour la PKC avec certains de ces substrats	580-600	Augmente l'affinité de l'IP ₃ R pour l'IP ₃	(Patterson et al., 2004)
	CDK1	Ser/Thr Kinase	T799; T1155	Sensibilise l'IP ₃ R à l'IP ₃	(Malathi et al., 2003, 2005; Sun et al., 2009)
	ERK1/2	Ser/Thr Kinase	T945	Sensibilise l'IP ₃ R à l'IP ₃	(Bai et al., 2006; Lee et al., 2006; Sun et al., 2009)
	GAPDH	Oxydation du glyceraldéhyde 3-phosphate	981-1000	Production de NADH par GAPDH augmente l'activité de l'IP ₃ R	(Kaplin et al., 1996; Patterson et al., 2005)
	DANGER	Régulation de l'IP ₃ R	923-1581	Augmente l'inhibition de l'IP ₃ R par le calcium	(Van Rossum et al., 2006)
	AKAP9	Protéine d'ancrage pour la PKA	1251-1287	Permet la phosphorylation de l'IP ₃ R par la PKA	(Tu et al., 2004)
	Bcl-2	Inhibiteur de l'apoptose	1347-1426	Diminue la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Chen et al., 2004; Hanson et al., 2008; Rong et al., 2008, 2009)
	CARP	?	1387-1647	Réduit l'affinité de l'IP ₃ R pour l'IP ₃	(Hirota et al., 2003)
	CaM	Régulateur Ca ²⁺ -dépendant ou non de l'activité de nombreuses protéines	1564-1585	Diminue la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Hirota et al., 1999b; Michikawa et al., 1999; Missiaen et al., 1999, 2000; Adkins et al., 2000; Sienaert et al., 2002)
	PKA	Ser/Thr Kinase	S1589; S1755	Augmente la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Ferris et al., 1991a; Hajnóczky et al., 1993; Nakade et al., 1994; Wojcikiewicz and Luo, 1998; DeSouza et al., 2002; Tang et al., 2003b)
	PP1α	Ser/Thr Phosphatase	S1589; S1755	Diminue la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Tang et al., 2003b)
	ATP	Nucléotide triphosphate	1773-1778; 2016-2021	Augmente la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Ferris et al., 1990; Maeda et al., 1991; Bezprozvanny and Ehrlich, 1993; Missiaen et al., 1997; Mak et al., 1999, 2001b; Foscett et al., 2007)
	Caspase-3	Protéase impliquée dans l'exécution de l'apoptose	1888-1892	Clivage de l'IP ₃ R au cours de l'apoptose	(Hirota et al., 1999a; Haug et al., 2000; Nakayama et al., 2004; Verbert et al., 2008)

Domaine du canal	ERp44	Repliement des protéines dans le RE	2463-2528	Diminue la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Higo et al., 2005)
	Chromogranines	Génération vésicules de sécrétion	2550-2569	Augmente la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Yoo and Lewis, 2000; Yoo et al., 2000; Thrower et al., 2002, 2003; Choe et al., 2004)
Domaine de couplage	Cytochrome c	Transfert des électrons dans la chaîne respiratoire. Participe à l'apoptose	2621-2636	Abolit l'effet inhibiteur du calcium sur l'IP ₃ R	(Boehning et al., 2003, 2005)
	Bcl-xL ; Mcl-1	Inhibiteur de l'apoptose	?	Sensibilise l'IP ₃ R à l'IP ₃	(White et al., 2005; Li et al., 2007; Eckenrode et al., 2010)
	Huntingtin	Impliquée dans la maladie d'Huntington	?	Augmente la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Tang et al., 2003a, 2004)
	PLK1	Ser/Thr Kinase	S2656	Sensibilise l'IP ₃ R à l'IP ₃	(Ito et al., 2008; Vanderheyden et al., 2009)
	Akt	Ser/Thr Kinase	S2681	Diminue la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Khan et al., 2006; Marchi et al., 2008; Szado et al., 2008)
	PP2A	Ser/Thr Phosphatase	S2681	Augmente la sortie de calcium via l'IP ₃ R	(Giorgi et al., 2010)

Tableau 2 : Régulateurs de l'activité de l'IP₃R

Les différentes protéines connues pour réguler l'activité de l'IP₃R sont présentées en fonction du domaine de l'IP₃R avec lequel elles interagissent. Lorsque cela est décrit le site d'interaction est précisé.

2.5.1 Régulation par le calcium

La fixation de l'IP₃ sur le récepteur est nécessaire pour son activation mais l'ouverture du canal nécessite également la présence de calcium qui joue un rôle de co-activateur (Finch et al., 1991; Marchant and Taylor, 1997). Le calcium cytosolique possède par ailleurs un effet biphasique sur l'ouverture du canal. Ainsi une faible augmentation de la concentration en calcium stimule la réponse à l'IP₃ alors qu'une concentration calcique plus importante inhibe le récepteur (Finch et al., 1991; Marshall and Taylor, 1993). Les 3 isoformes de l'IP₃R sont régulées de façon biphasique par le calcium bien que quelques différences existent. Ainsi, le

calcium semble activer l'IP₃R1 avec une coopérativité positive permettant l'ouverture du canal sur une étroite gamme de concentration relativement élevée de calcium suggérant que l'IP₃R1 pourrait principalement participer au CICR. L'activation de l'IP₃R3 par le calcium est en revanche moins coopérative et se produit à des concentrations inférieures laissant penser que cette isoforme permettrait plutôt un relargage de calcium quand la concentration d'IP₃ augmente (Foskett et al., 2007).

2.5.1.1 Mécanisme de régulation par le calcium

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet biphasique du calcium sur le récepteur. Ces mécanismes s'accordent sur l'existence d'au moins 2 types de sites de liaison du calcium sur le récepteur, l'un de haute affinité et l'autre de faible affinité.

Le premier mécanisme, proposé par l'équipe de C.W. Taylor, est basé sur l'analyse d'études réalisées par la méthode de superfusion rapide permettant une mesure rapide (de l'ordre de 10 ms) de la sortie de calcium après ajout d'IP₃ (Marchant and Taylor, 1997; Adkins and Taylor, 1999; Swatton and Taylor, 2002). Sur la base de leurs résultats, le groupe de C.W Taylor propose un mécanisme selon lequel en absence d'IP₃ le calcium se lie sur un site inhibiteur de haute affinité afin de garder le canal fermé. La fixation de l'IP₃ diminuerait alors l'affinité du site inhibiteur tout en révélant un site activateur permettant l'ouverture du canal. Le calcium ne pourrait alors inhiber l'IP₃R qu'après détachement de l'IP₃ ou lorsque l'IP₃ est absent et ainsi le calcium sortant d'un récepteur inhiberait l'activité de ses voisins plutôt que la sienne.

Le deuxième modèle proposé par le groupe de J.K Foskett s'appuie sur des études réalisées en patch-clamp sur des membranes nucléaires (Mak et al., 1998, 2001a, 2003). En s'appuyant sur leurs résultats et sur le modèle allostérique de Monod-Wyman-Changeux, les auteurs ont proposé plusieurs modèles qu'ils ont soumis à différents calculs afin d'obtenir des valeurs de probabilité d'ouverture en fonction des concentrations d'IP₃ et de Ca²⁺. Ces calculs leur ont alors permis de sélectionner un modèle allostérique de régulation de l'ouverture du canal par le calcium et l'IP₃. Dans le modèle retenu, chaque monomère possède 3 sites de fixation de calcium dont un seul est sensible à la liaison de l'IP₃. Ce site dépendant de l'IP₃ posséderait une haute affinité pour le calcium et serait inhibiteur en l'absence d'IP₃ alors que la fixation de l'IP₃ rendrait ce site activateur. De plus chaque sous-unité posséderait également un site inhibiteur de faible affinité pour le calcium qui serait responsable de l'inhibition de l'IP₃R en présence de haute concentration de Ca²⁺. L'activité de ce site ne dépendrait pas de la fixation de l'IP₃ sur le récepteur. Finalement, les auteurs proposent

l'existence d'un troisième site de fixation de calcium qui serait également indépendant de la liaison de l'IP₃. Ce site d'affinité moyenne serait responsable des différences de coopérativité observées pour l'activation par le calcium selon les isoformes (Mak et al., 1998, 2001a).

Finalement, un dernier modèle a récemment été proposé par le groupe de K. Mikoshiba (Shinohara et al., 2011). Contrairement aux modèles précédents, celui-ci n'est pas basé sur la mesure de relargage de calcium mais sur l'observation des changements conformationnels des tétramères induits par l'IP₃ et par le calcium. À partir de leurs données, les auteurs ont proposé un modèle dans lequel il existe 4 sites de liaison de calcium, 2 sites activateurs de faible affinité et 2 sites inhibiteurs de haute affinité. La liaison du calcium se ferait de façon séquentielle avec la fixation simultanée de 2 ions Ca²⁺ sur les sites activateurs en premier lieu puis sur les sites inhibiteurs ensuite. La fixation de 3 ou 4 ions Ca²⁺ empêcherait alors la fixation de l'IP₃ sur le récepteur. Cependant l'IP₃ pourrait se fixer sur le récepteur dont les deux sites activateurs seraient occupés et inversement la fixation de l'IP₃ permettrait la fixation du calcium sur les sites activateurs. En revanche, la présence d'IP₃ empêcherait la liaison du calcium sur les sites inhibiteurs. Les auteurs proposent que la compétition entre la fixation de l'IP₃ et la fixation du calcium sur les sites inhibiteurs est responsable de l'effet biphasique du calcium sur l'IP₃R.

2.5.1.2 Sites de liaison du calcium

Bien que la présence de différents sites de fixation de calcium dans l'IP₃R semble nécessaire pour rendre compte de la régulation du canal par cet ion, l'identité de ces sites reste encore aujourd'hui assez floue. Au moins 7 sites de liaison de calcium ont été identifiés sur la partie cytosolique du récepteur (Sienaert et al., 1996, 1997). Aucun de ces sites ne présente de motifs EF-hand ou d'autres motifs connus pour lier le calcium, cependant ils possèdent tous un groupe de résidus chargés négativement.

Deux de ces sites (résidus 304-381 et 378-450) sont situés dans le domaine de liaison de l'IP₃. De façon intéressante, lors de la résolution de la structure 3D de ce domaine, Bosanac et collaborateurs ont suggéré l'existence de 2 sites possibles de liaison de calcium dénommés CaI (E246, E425, D426, E428) et CaII (E283, E285, D444, D448). La mutation ponctuelle de plusieurs résidus acides dans la région 378-450 a montré que cette région n'est pas impliquée dans l'activation du canal par le calcium puisqu'aucune des mutations étudiées ne modifie celle-ci (Joseph et al., 2005). Cependant, il apparaît que les régions CaI et CaII pourraient jouer un rôle dans l'inhibition par le calcium. En effet, la mutation D444N réduit considérablement l'inhibition du canal par le calcium, la mutation D442N ayant le même effet

(Joseph et al., 2005). Bien que le résidu 442 ne soit pas prédit comme appartenant au site CaII, il pourrait tout de même jouer un rôle dans la fixation du calcium au niveau de ce site étant donné sa proximité avec le résidu 444. Ainsi, le site CaII pourrait être impliqué dans l'inhibition du canal par le calcium bien qu'un effet direct de la fixation de calcium sur ce site reste encore à démontrer. De façon surprenante, la mutation de résidus appartenant au domaine CaI (D426N et E428Q) augmente au contraire l'effet inhibiteur du calcium (Joseph et al., 2005). Ceci suggère que ce site n'est pas directement impliqué dans l'inhibition par le calcium mais il pourrait cependant interagir avec une autre région du récepteur importante pour la régulation négative par le calcium.

Les autres sites décrits se situent tous dans le domaine central de modulation. Le site 1347-1426 ne semble pas impliqué dans la régulation par le calcium puisque la mutation de 4 résidus acides conservés dans cette région (D1347N, E1393Q, E1404N et E1418Q) n'altère pas la sensibilité au calcium du canal (Joseph et al., 2005). Un résidu glutamate situé à la fin du domaine central semble toutefois important pour la régulation du canal par le calcium. En effet, la mutation de ce résidu (E2100) modifie la sensibilité du récepteur au calcium à la fois pour l'activation et l'inhibition et diminue l'affinité de la région environnante (1932-2270) pour le calcium (Miyakawa et al., 2001; Tu et al., 2003). Ces résultats suggèrent que le résidu E2100 pourrait appartenir à la fois aux sites activateur et inhibiteur ou bien pourrait faire partie du site dépendant de l'IP₃ décrit par le groupe de J.K. Foskett (voir partie 2.5.1.1).

Finalement, un site de liaison au calcium a également été décrit sur la face luminale du récepteur (Sienaert et al., 1996, 1997). Peu après la découverte de l'IP₃R il a été proposé un rôle pour le calcium luminal dans le relargage « quantique » du calcium par l'IP₃R (Irvine, 1990) suggérant que la diminution de la quantité de calcium dans le RE pourrait être « sentie » par le récepteur qui se refermerait alors avant que le stock ne soit vidé. Cependant les preuves expérimentales d'un tel mécanisme sont pour le moment absentes. En effet, bien que certaines études montrent qu'une augmentation de la quantité de calcium dans les stocks intracellulaires augmente la sensibilité de l'IP₃R à l'IP₃ (Parys et al., 1993; Missiaen et al., 1994; Combettes et al., 1996; Tanimura and Turner, 1996), d'autres suggèrent au contraire une diminution d'activité de l'IP₃R lorsque la concentration luminale de calcium est augmentée (Bezprozvanny and Ehrlich, 1994; Thrower et al., 2000). Plus récemment, il a même été suggéré que le calcium luminal n'affecterait l'activité d'IP₃R que du seul fait de l'augmentation importante de la concentration locale de calcium cytosolique à proximité du canal induite par le flux de calcium dirigé par la concentration luminale de calcium (Vais et al., 2012).

2.5.2 Régulation par l'ATP

L'ATP est capable de réguler l'activité de l'IP₃R de façon dépendante de sa concentration. Ainsi, des concentrations sub-millimolaires d'ATP favorisent l'ouverture de l'IP₃R alors que des concentrations plus élevées d'ATP le maintiennent fermé (Ferris et al., 1990; Maeda et al., 1991; Bezprozvanny and Ehrlich, 1993; Missiaen et al., 1997). L'effet inhibiteur de l'ATP a été attribué à sa capacité à inhiber de façon compétitive la liaison de l'IP₃ sur son site de fixation. Ainsi, les groupements phosphates de l'ATP pourraient interagir avec les résidus de l'IP₃R impliqués dans l'interaction avec les groupements phosphates de l'IP₃ (Maeda et al., 1991; Maes et al., 2000). L'effet activateur de l'ATP semble quant à lui reposer sur une régulation allostérique du récepteur qui augmenterait sa sensibilité au calcium. En effet, en absence d'ATP, les isoformes 1 et 3 de l'IP₃R sont régulées de façon identique par le calcium alors qu'en présence d'ATP le calcium n'a pas le même effet sur ces deux isoformes (Foskett et al., 2007). De façon intéressante il apparaît que l'ATP ne possède pas la même affinité pour ces deux isoformes (Maes et al., 2000). Ceci est attribué à une différence de sites de liaison de l'ATP entre l'isoforme 1 et 3 de l'IP₃R. En effet, deux sites de fixation d'ATP (séquence riche en glycine : GxGxxG) ont pu être identifiés dans le domaine central de modulation. L'un, nommé ATPA et situé entre les résidus 1773 et 1778, n'est présent que dans l'isoforme 1 alors que l'autre, ATPB situé entre les résidus 2016-2021, est présent dans les trois isoformes d'IP₃R (Maes et al., 1999). Il faut également noter que le variant d'épissage S2- de l'IP₃R1 possède un site supplémentaire de fixation de l'ATP (ATPC). La contribution de ce site à la régulation du canal par l'ATP n'est cependant pas clairement établie. L'affinité apparente des IP₃R1 et 3 pour l'ATP est d'environ 300 μ M (Mak et al., 1999, 2001b) ce qui de façon intéressante coïncide avec la concentration cytosolique d'ATP libre (400-600 μ M). Ainsi l'IP₃R semble en mesure de détecter des variations de la concentration d'ATP. Le relargage de calcium pourrait donc dépendre de l'état métabolique de la cellule.

2.5.3 Régulation par la calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine cytosolique liant le calcium qui agit comme un régulateur Ca²⁺-dépendant de nombreuses protéines. La CaM peut se lier à ses partenaires sous sa forme liée au calcium (CaCaM) ou sans calcium (ApoCaM).

Il a été montré que la surexpression de la CaM inhibe le relargage de calcium par l'IP₃R dans des cellules en cultures (Missiaen et al., 1999, 2000; Adkins et al., 2000). La CaM inhibe également l'IP₃R reconstitué dans des bicouches lipidiques ou des liposomes (Hirota et

al., 1999b; Michikawa et al., 1999). Dans ces études la CaM inhibe l'IP₃R en présence de concentrations élevées de Ca²⁺ sans affecter son activité à faible concentration de Ca²⁺. La CaM pourrait ainsi participer à la régulation biphasique qu'exerce le calcium sur l'IP₃R et plus particulièrement à l'inhibition du canal. Il existe un site de liaison de la CaCaM dans la partie centrale du récepteur (1564-1585). Ce site n'est en revanche présent que dans les isoformes 1 et 2 de l'IP₃R (Yamada et al., 1995; Lin et al., 2000). De plus, la mutation W1557A, abolissant l'interaction avec la CaCaM, n'a pas d'effet sur l'inhibition de l'IP₃R ni par le calcium ni par la CaM (Zhang and Joseph, 2001; Nosyreva et al., 2002). Ainsi, ce site ne semble pas responsable de l'inhibition de l'IP₃R par la CaM et jusqu'à présent il n'existe pas d'autres données permettant d'éclaircir ce mécanisme.

De plus il a été montré que la CaM inhibe la fixation de l'IP₃ sur l'IP₃R de façon indépendante du calcium (Patel et al., 1997; Cardy and Taylor, 1998; Sipma et al., 1999). Le site de liaison de l'ApoCaM semble se situer dans le domaine suppresseur (Adkins et al., 2000). De plus, il a été montré que des peptides correspondant aux régions 49-81 et 106-128 de l'IP₃R1 se lient à l'ApoCaM et sont capables de lever l'inhibition exercée par la CaM sur la fixation de l'IP₃, suggérant que ces deux régions pourraient former un site de liaison à l'ApoCaM (Sienaert et al., 2002). Cependant et de façon surprenante, une forme mutée de la CaM ne fixant pas le calcium est capable d'inhiber le relargage de calcium via IP₃R mais uniquement en présence de haute concentrations de calcium. Cette inhibition passerait également par une interaction avec le domaine N-terminal. Ainsi, la CaM pourrait inhiber le canal de façon dépendante du calcium sans pour autant fixer ce dernier (Kasri et al., 2004a). De façon intéressante, un motif 1-8-14 de liaison à la CaM a récemment été décrit dans le domaine suppresseur. Ce motif semble important pour l'activité du canal (Sun et al., 2013). L'interaction de la CaM avec ce motif pourrait être responsable de son activité inhibitrice de l'IP₃R. Ainsi, bien qu'un rôle inhibiteur de la CaM sur l'IP₃R soit clairement établi, le mécanisme sous-jacent reste encore à éclaircir.

2.5.4 Régulation par IRBIT

IRBIT (IP₃R Binding protein released with Inositol 1,4,5-Trisphosphate) a été identifiée lors d'une étude ayant pour but de découvrir des partenaires de l'IP₃R dont l'interaction pourrait être régulée par l'IP₃. IRBIT est ainsi caractérisée par sa capacité à être relarguée de l'IP₃R après fixation de l'IP₃ (Ando et al., 2003). IRBIT possède un domaine C-terminal possédant 50% d'homologie avec la S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY). Cependant IRBIT ne semble pas avoir d'activité hydrolase. De plus IRBIT possède une

région PDZ-ligand en C-terminal (Devogelaere et al., 2006). La partie N-terminale d'IRBIT n'est en revanche homologue à aucune protéine connue mais elle arbore une région riche en résidus sérine, sept sites potentiels de phosphorylation (Ando et al., 2003) ainsi qu'un motif PEST (Devogelaere et al., 2006). IRBIT interagit avec le domaine N-terminal de liaison de l'IP₃ de l'IP₃R et il apparaît qu'IRBIT est dissociée de l'IP₃R par des concentrations physiologiques d'IP₃ (Ando et al., 2003). Cependant, alors qu'une étude a montré qu'IRBIT peut interagir avec le domaine de liaison de l'IP₃ (Ando et al., 2003) une autre suggère que le domaine suppresseur est également nécessaire pour l'interaction (Devogelaere et al., 2006). L'interaction d'IRBIT avec le domaine N-terminal de l'IP₃R dépend principalement de son domaine N-terminal bien que le domaine PDZ-ligand semble important pour stabiliser l'interaction probablement en se liant au domaine suppresseur (Ando et al., 2003; Devogelaere et al., 2006).

IRBIT inhibe la fixation d'IP₃ sur son récepteur entraînant ainsi une diminution du relargage de calcium par l'IP₃R dans des cellules perméabilisées (Devogelaere et al., 2006). Ces résultats ont été confirmés en microsomes, où l'ajout d'IRBIT diminue la sortie de calcium en réponse à l'IP₃, mais aussi dans des cellules intactes où l'invalidation d'IRBIT s'accompagne d'une augmentation de la sortie de calcium en réponse à l'IP₃ (Ando et al., 2006). Dans cette dernière étude il a de plus été montré qu'IRBIT partage le même site de fixation que l'IP₃ dans le domaine N-terminal de l'IP₃R. En effet, la mutation de 10 des 12 résidus impliqués dans la liaison de l'IP₃ (R241, K249, R269, R504, R506, K508, R511, Y567, R568, et K569) abolit l'interaction d'IRBIT avec l'IP₃R. Ainsi IRBIT semble agir en entrant en compétition avec l'IP₃ au niveau d'un site commun de fixation (Ando et al., 2006). La fixation d'IRBIT semble par ailleurs dépendante de sa phosphorylation avec les résidus sérine 68, 71 et 74 jouant un rôle crucial puisque leur mutation abroge l'interaction avec l'IP₃R (Ando et al., 2006). De plus le traitement d'IRBIT par la phosphatase alcaline ou la mutation S68A diminue son rôle inhibiteur sur la fixation de l'IP₃ montrant que la phosphorylation d'IRBIT est essentielle pour son activité sur l'IP₃R (Ando et al., 2006).

La phosphorylation d'IRBIT dépend en partie de la caséine kinase I (CKI). Cette sérine/thréonine kinase phosphoryle ses substrats sur le dernier résidu du motif pS-X-X-S/T où pS représente un résidu sérine phosphorylé. Ainsi CK1 peut phosphoryler IRBIT lorsque le résidu S68 est déjà phosphorylé par une autre kinase (Ando et al., 2006). Le résidu S68 appartient à un site potentiel de phosphorylation par la Protéine Kinase D (PKD) et cette kinase est bien capable de phosphoryler IRBIT *in vitro* (Devogelaere et al., 2007). De plus, alors que la CK1 n'est pas capable de phosphoryler IRBIT *in vitro*, la combinaison de la PKD

et de la CK1 s'accompagne d'une phosphorylation synergique d'IRBIT. Cette synergie est abolie par la mutation S68A suggérant fortement que la phosphorylation du résidu S68 par la PKD est un signal pour la phosphorylation des résidus suivants par la CK1 (Devogelaere et al., 2007). Ainsi les auteurs ont pu montrer par spectrométrie de masse que les résidus S68, S71 et S74 sont bien phosphorylés après incubation avec la PKD et la CK1. En revanche, les résidus suivants S77 et S80, également présent dans un site de phosphorylation potentiel par la CK1, ne sont pas phosphorylés dans ce test (Devogelaere et al., 2007). La phosphorylation de ces trois résidus pourrait ainsi mimer les 3 groupements phosphates de l'IP₃ bien que la phosphorylation des résidus S71 et S74 semble suffisante pour inhiber la fixation de l'IP₃ (Devogelaere et al., 2007). Cette étude a également identifié la Protéine Phosphatase 1 (PP1) comme un régulateur potentiel de l'activité d'IRBIT sur l'IP₃R. En effet, la PP1 interagit avec IRBIT et semble capable de promouvoir spécifiquement la déphosphorylation du résidu S68. Ceci semble avoir un effet sur l'activité d'IP₃R puisque un mutant d'IRBIT n'interagissant plus avec la PP1, interagit plus avec l'IP₃R que la forme sauvage *in cellulo* (Devogelaere et al., 2007). Ainsi, la PP1 et la PKD pourraient contrôler l'activité d'IRBIT sur l'IP₃R en modulant la phosphorylation du résidu S68 et donc la phosphorylation ultérieure des résidus S71 et S74 essentiels pour l'interaction avec l'IP₃R. De façon intéressante, bien que cette étude se soit intéressée à l'action de la PKD, il semble que le résidu S68 appartienne à un site pouvant être reconnu par de nombreuses kinases dont les CaMK (Calmodulin-dependent Kinase) I, II et IV (Devogelaere et al., 2007). La phosphorylation d'IRBIT pourrait donc être sous contrôle du calcium et ainsi participer à l'effet répresseur du calcium sur l'IP₃R.

2.5.5 Régulation par les protéines de la famille Bcl-2

Comme décrit dans la partie 1, les protéines de la famille Bcl-2 font partie des principaux régulateurs de l'apoptose. Les protéines Bcl-2 sont capables de réguler l'activité de l'IP₃R bien que différents membres de la famille semblent exercer des actions distinctes sur celui-ci.

Bcl-2 interagit avec l'IP₃R au niveau du domaine de modulation entre les résidus 1347 et 1426 (Rong et al., 2008). Bcl-2 agit sur l'IP₃R en diminuant la perméabilité du canal. Cet effet a pu être observé à la fois dans des cellules perméabilisées, dans des expériences en patch-clamp et en cellules intactes (Chen et al., 2004; Hanson et al., 2008). Bcl-2 interagit avec l'IP₃R par l'intermédiaire de son domaine BH4, ce domaine étant suffisant pour réguler la perméabilité du canal (Rong et al., 2009). De plus, il a été montré qu'un peptide dérivé de la région 1347-1426 de l'IP₃R1 permet de rompre l'interaction entre Bcl-2 et l'IP₃R sans pour

autant modifier l'association de Bcl-2 avec les protéines BH3-only. Ce peptide permet de sensibiliser les cellules à l'apoptose suggérant fortement que l'interaction avec l'IP₃R participe activement à l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 (Rong et al., 2008; Zhong et al., 2011; Akl et al., 2013).

Bcl-xL quant à lui interagit avec le domaine de couplage de l'IP₃R. Contrairement à Bcl-2, Bcl-xL ne diminue pas la sortie de calcium via l'IP₃R mais semble plutôt sensibiliser le récepteur à de faibles quantités d'IP₃. Ainsi, Bcl-xL favorise les échanges calciques entre le RE et la mitochondrie ce qui permet d'augmenter le métabolisme énergétique et donc la survie de la cellule (White et al., 2005). Bcl-xL sensibilise les 3 isoformes de l'IP₃R à de faibles quantités d'IP₃ suggérant que ce mécanisme de protection est certainement partagé par de nombreuses cellules (Li et al., 2007). Une autre étude a montré que Bcl-2 et Mcl-1 pourrait agir comme Bcl-xL en interagissant avec le domaine de couplage de l'IP₃R (Eckenrode et al., 2010). Ces résultats sur Bcl-2 sont difficilement conciliables avec les effets observés avec le peptide 1347-1426 dans différents types cellulaires. Cependant, une étude plus récente propose que Bcl-2 et Bcl-xL pourraient tous les deux interagir avec le domaine de modulation et le domaine de couplage de l'IP₃R. En revanche, il semble que Bcl-2 ait plus d'affinité pour le domaine de modulation alors que Bcl-xL interagit préférentiellement avec le domaine de couplage (Monaco et al., 2012a). Cette différence est attribuée à un résidu clé dans le domaine BH4 de ces deux protéines. En effet, Bcl-2 possède dans ce domaine un résidu lysine qui n'est pas conservé dans Bcl-xL où l'on retrouve à la place un résidu aspartate (Monaco et al., 2012b). La mutation du résidu lysine en aspartate dans le BH4 de Bcl-2 réduit considérablement son interaction avec le domaine de modulation ainsi que son activité régulatrice sur l'IP₃R. Inversement, la mutation du résidu aspartate en lysine rend le domaine BH4 de Bcl-xL capable d'inhiber la sortie de calcium de l'IP₃R. Ainsi, les protéines Bcl-2, du fait de la présence de résidus clés dans leur domaine BH4 semblent cibler différentes régions de l'IP₃R exerçant ainsi différents effets sur le canal.

Finalement, il a été proposé que Bcl-2 puisse également contrôler la phosphorylation de l'IP₃R et ainsi modifier son activité (Oakes et al., 2005). Dans cette étude, les auteurs ont observé qu'en absence de Bax et Bak, l'interaction entre Bcl-2 et l'IP₃R est augmentée de parallèlement à la phosphorylation de l'IP₃R sur le résidu S1755. On sait d'autre part que la phosphorylation de ce résidu par la PKA sensibilise le récepteur à l'IP₃ (voir partie 2.5.8.1). Le mécanisme par lequel Bcl-2 favorise la phosphorylation de l'IP₃R n'est pas décrit mais les auteurs suggèrent qu'en jouant ce rôle, Bcl-2 permet de diminuer la quantité de calcium dans le RE protégeant alors les cellules en cas de stress.

2.5.6 Régulation par le cytochrome c

Le cytochrome c est une protéine impliquée dans le transport des électrons dans la chaîne respiratoire. En revanche, le relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol est un événement clé de l'apoptose (Voir partie 1.3.3.1.1 pour plus de détails). Ainsi, en plus de son rôle dans la formation de l'apoptosome, le cytochrome c semble également capable d'amplifier la réponse apoptotique en interagissant avec l'IP₃R.

Ainsi, le cytochrome c peut se lier au domaine C-terminal de couplage de l'IP₃R. Cette interaction semble abolir l'effet inhibiteur du calcium sur l'ouverture du canal (Boehning et al., 2003). Dans cette étude, les auteurs ont montré que lors de l'apoptose le cytochrome c est effectivement redirigé vers le RE où il interagit avec l'IP₃R avant même l'activation des caspases. L'interaction entre l'IP₃R et le cytochrome c permettrait ainsi un relargage prolongé de calcium lors de l'initiation de l'apoptose. Ceci permettrait d'amplifier la réponse apoptotique en entraînant une surcharge calcique des mitochondries encore intactes qui relargueraient le cytochrome c à leur tour. Le cytochrome c semble interagir avec le domaine de couplage de l'IP₃R entre les résidus 2621 et 2636 (Boehning et al., 2005). Les auteurs de cette étude ont synthétisé un peptide correspondant à cette région afin d'inhiber l'association entre le cytochrome c et l'IP₃R. L'expression de ce peptide semble inhiber de façon efficace l'apoptose induite par la staurosporine dans des cellules HeLa mais aussi celle induite par Fas dans des cellules Jurkat (Boehning et al., 2005). Ces résultats suggèrent donc que l'interaction entre le cytochrome c et l'IP₃R pourrait être un élément clé de l'initiation des voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose en réponse à certains stress.

2.5.7 Clivage par la caspase-3

La caspase-3 est une caspase effectrice qui est activée aussi bien dans la voie intrinsèque que dans la voie extrinsèque de l'apoptose (Voir partie 1.3.1.2). Le domaine de modulation de l'IP₃R1 contient un site de clivage par la caspase entre les résidus 1888 et 1892 et il apparaît que l'IP₃R1 est clivé par la caspase-3 durant l'apoptose (Hirota et al., 1999a; Haug et al., 2000). Ce site n'est pas présent dans les deux autres isoformes d'IP₃R suggérant un rôle spécifique de l'IP₃R1 dans l'apoptose. Des cellules triple-knockout pour les IP₃R sont par ailleurs résistantes à l'apoptose induite par la staurosporine (Assefa et al., 2004). Cependant, la réexpression de l'IP₃R1 dans ces cellules restaure leur sensibilité aux stimuli apoptotiques alors que l'expression de l'IP₃R1 muté sur le site de clivage à la caspase-3 diminue considérablement cette resensibilisation (Assefa et al., 2004). Ces résultats suggèrent fortement un rôle pour le clivage de l'IP₃R1 dans la réponse apoptotique. Il a par ailleurs été

proposé le clivage d'IP₃R1 par la caspase-3 induirait une dérégulation de l'homéostasie calcique participant à la progression de l'apoptose. En effet, l'expression en cellules de la partie C-terminale du récepteur résultant du clivage à la caspase semble induire la déplétion du stock de calcium dans le RE en augmentant les fuites de calcium (Nakayama et al., 2004; Verbert et al., 2008). Ainsi, une fois clivé, l'IP₃R pourrait induire une augmentation importante de la concentration cytosolique de calcium qui contribuerait à l'induction de l'apoptose.

Cependant, ce mécanisme est remis en cause par une étude récente qui montre que l'IP₃R1 peut conserver son activité après clivage par la caspase-3. Dans cette étude les auteurs montrent qu'au cours de l'apoptose le clivage de l'IP₃R1 par la caspase-3 a lieu mais que le fragment cytosolique clivé reste associé à la membrane du RE (Alzayady et al., 2013). De plus, il semble que les deux fragments générés par le clivage à la caspase-3 soient capables d'interagir et même de s'associer en tétramères lorsqu'ils sont co-exprimés. Ces tétramères semblent de plus fonctionnels puisque la co-expression des deux fragments d'IP₃R permet le relargage de calcium en réponse à l'IP₃ dans des cellules triple-knockout pour les IP₃Rs (Alzayady et al., 2013). Des observations similaires avaient été effectuées après le clivage du récepteur par la trypsine où le canal conserve une certaine intégrité structurale et fonctionnelle (Yoshikawa et al., 1999b). Ainsi, à ce jour l'implication du clivage de l'IP₃R1 par la caspase-3 dans le processus apoptotique est toujours controversée.

2.5.8 Régulation par phosphorylation

2.5.8.1 Régulation par la PKA

La protéine Kinase A (PKA) est une sérine/thréonine kinase activée par l'AMP cyclique (AMPc). L'AMPc, au même titre que le calcium, est un important second messenger impliqué dans de très nombreux processus cellulaires. De manière intéressante l'IP₃R est une cible de la PKA, ce qui fait de cette kinase un « pont » reliant deux des principales voies de signalisation de la cellule. La phosphorylation de l'IP₃R par la PKA a été décrite avant même que l'IP₃R ne soit caractérisé en tant que canal calcique liant l'IP₃ (Mikoshiba et al., 1985; Yamamoto et al., 1989). Cependant l'effet de la phosphorylation de la PKA sur l'activité de l'IP₃R est longtemps resté un sujet de controverse. Aujourd'hui il est tout de même généralement accepté que la PKA a un effet activateur sur l'IP₃R.

L'IP₃R1 peut être phosphorylé par la PKA sur deux résidus sérines du domaine de modulation, les résidus S1589 et S1755 (Ferris et al., 1991a). Ces deux résidus sont séparés

par le domaine d'épissage S2 et il apparaît que les deux isoformes d'IP₃R1 sont phosphorylées différemment. Ainsi l'isoforme S2⁺ semble préférentiellement phosphorylée sur le résidu S1755 alors que le variant S2⁻ est plutôt phosphorylé sur le résidu S1589 (Danoff et al., 1991). Cette différence semble provenir de l'apparition du site ATPC de liaison à l'ATP dans l'isoforme S2⁻ puisque la mutation d'un résidu glycine dans ce site abolit la phosphorylation d'IP₃R1 par la PKA (Wagner et al., 2006).

L'effet activateur de la phosphorylation de l'IP₃R par la PKA a pu être observé sur l'IP₃R reconstitué en vésicules lipidiques (Nakade et al., 1994), lors de mesures en patch-clamp (DeSouza et al., 2002; Tang et al., 2003b) et dans des cellules perméabilisées (Hajnóczky et al., 1993; Wojcikiewicz and Luo, 1998). Ces études ont permis d'établir que la phosphorylation par la PKA sensibilise l'IP₃R à de plus faibles quantités d'IP₃. Cet effet n'est cependant pas dû à un changement d'affinité du récepteur pour l'IP₃ ni à une modification de la régulation par le calcium (Wagner et al., 2008). Il a aussi été montré que l'élévation du niveau d'AMPc augmente l'activité de l'IP₃R1 exprimé dans des cellules intactes triple-knockout pour les IP₃Rs. Dans ce modèle, l'implication des résidus S1589 et S1755 a pu être confirmée puisque la mutation S1589A abolit l'activation de l'isoforme S2⁺ de l'IP₃R1 par l'AMPc. Cependant seule la double mutation S1589A/S1755A a un effet sur l'activation de l'isoforme S2⁻ de l'IP₃R1 par l'AMPc suggérant que la PKA phosphoryle les deux résidus dans le variant S2⁻ (Wagner et al., 2003). De la même façon les mutations S1589E et S1589E/S1755E aboutissent à des récepteurs S2⁺ et S2⁻ respectivement possédant une activité supérieure aux récepteurs sauvages (Wagner et al., 2004b, 2008).

L'interaction de la PKA avec l'IP₃R1 n'est pas directe et passe par une association avec la protéine d'ancrage AKAP9 qui interagit avec le domaine de modulation au niveau des résidus 1251-1287 (Tu et al., 2004). AKAP9 semble également recruter la protéine phosphatase 1α (PP1α) au niveau de l'IP₃R1 (Tu et al., 2004). PP1 α est capable d'interagir avec IP₃R1 sur le domaine de couplage ce qui lui permet de déphosphoryler les résidus cibles de la PKA (Tang et al., 2003b). Ainsi la PKA et PP1α semble agir de façon antagoniste au sein d'un complexe qui régule l'activité d'IP₃R1 en réponse aux variations d'AMPc.

Les deux résidus S1589 et S1755 ne sont pas conservés dans les isoformes 2 et 3 de l'IP₃R. Cependant, il semble que ces deux isoformes puissent aussi être phosphorylées dans une moindre mesure par la PKA (Wojcikiewicz and Luo, 1998). L'IP₃R2 semble également activé par la PKA (Bruce et al., 2002; Regimbald-Dumas et al., 2007) alors que les résultats concernant l'IP₃R3 sont contradictoires. En effet, certaines études rapportent un effet activateur (LeBeau et al., 1999; Giovannucci et al., 2000; Straub et al., 2002) alors que

d'autres au contraire concluent que la PKA inhibe l'IP₃R3 (Wojcikiewicz and Luo, 1998; Dyer et al., 2003; Chaloux et al., 2007). Trois résidus de l'IP₃R3 semblent par ailleurs phosphorylés par la PKA, les résidus S916, S934 et S1832, le premier l'étant préférentiellement (Soulsby and Wojcikiewicz, 2005). Cependant la mutation de ces résidus n'a aucun effet sur la régulation des flux calciques par la PKA en cellules triple-knockout pour les IP₃Rs où l'IP₃R3 est réexprimé (Soulsby and Wojcikiewicz, 2007).

Finalement, il a été récemment suggéré que l'AMPc pourrait également réguler les trois isoformes de l'IP₃R indépendamment de la PKA. L'AMPc semble interagir directement avec l'IP₃R2 sur un site distinct de celui fixant l'ATP, induisant une sensibilisation du canal à l'IP₃ (Tovey et al., 2010). Dans leur ensemble, ces résultats montrent qu'il existe bien une interconnexion entre la signalisation de l'AMPc et la signalisation calcique bien que les mécanismes sous-jacents restent encore à éclaircir.

2.5.8.2 Régulation par la CaMKII

La Ca²⁺/CaM-dependent kinase II (CaMKII) appartient à une famille de sérine/thréonine kinases activées par la calmoduline liée au calcium. Une phosphorylation de l'IP₃R par la CaMKII a été rapidement décrite après la découverte du récepteur (Yamamoto et al., 1989; Ferris et al., 1991b). Toutes les études concernant l'action de la CaMKII sur l'activité de l'IP₃R s'accordent sur un effet inhibiteur de la CaMKII. Ainsi, dans des cellules *n* culture, l'inhibition de la CaMKII par des inhibiteurs pharmacologiques potentialise le relargage de calcium par l'IP₃R et à l'inverse l'expression d'une forme constitutivement active de la kinase inhibe l'activité du canal calcique (Zhu et al., 1996). Le même effet a été observé lors de l'utilisation d'inhibiteurs de la CaMKII dans l'ovocyte de xénope (Matifat et al., 2001).

Il a de plus été montré que la CaMKII interagit avec l'IP₃R2 et le phosphoryle dans la région 1-1078 (Bare et al., 2005). Dans cette étude, la phosphorylation *in vitro* de l'IP₃R2 par la CaMKII réduit considérablement son ouverture en bicouche lipidique (Bare et al., 2005). Plus récemment, le même groupe a pu observer *in vitro* et *in vivo* une phosphorylation par la CaMKII du résidu S150 situé dans le domaine suppresseur de l'IP₃R2 (Maxwell et al., 2012). La mutation S150A prévient l'effet inhibiteur de la CaMKII sur l'activité du récepteur reconstitué en bicouche lipidique alors que la mutation S150E mime l'effet de la CaMKII. Finalement, le résidu S150 correspond à un résidu thréonine dans l'IP₃R1 et 3 suggérant que la CaMKII pourrait phosphoryler ces deux isoformes de la même façon.

Ainsi, du fait de son activation par le calcium, la CaMKII pourrait faire partie de la machinerie exerçant une régulation négative sur l'IP₃R consécutivement au relargage de calcium par le récepteur.

2.5.8.3 Régulation par la PKC

La protéine kinase C (PKC) appartient à la même famille de sérine/thréonine kinases que la PKA. La PKC possède plusieurs isoformes dont la majorité est activée par le DAG, produit en même temps que l'IP₃ par la PLC. Certaines isoformes nécessitent aussi du calcium pour être activées alors qu'un troisième groupe de PKC ne requiert ni DAG ni calcium.

In vitro la PKC phosphoryle l'IP₃R sur un site différent de ceux phosphorylés par la PKA et la CaMKII (Ferris et al., 1991b). Selon l'isoforme de l'IP₃R, il existe entre trois et six sites potentiels de phosphorylation par la PKC (Patel et al., 1999) mais jusqu'à aujourd'hui le ou les sites exacts de phosphorylation n'ont pu être identifiés. La phosphorylation de l'IP₃R1 par la PKC semble avoir un effet activateur sur le canal. En effet, la PKC peut phosphoryler l'IP₃R1 situé au niveau de l'enveloppe nucléaire augmentant le relargage de calcium en réponse à l'IP₃ sans pour autant modifier la fixation du ligand sur le récepteur (Matter et al., 1993). De plus, la calcineurine, une phosphatase calcium-dépendante, est associée à l'IP₃R1 et déphosphoryle spécifiquement les résidus ciblés par la PKC (Cameron et al., 1995). En effet, l'inhibition de la calcineurine par des inhibiteurs pharmacologiques ainsi que l'ajout de protéines rompant son interaction avec l'IP₃R1 augmentent considérablement la phosphorylation de l'IP₃R1 par la PKC, alors que cela n'a pas d'effet sur la phosphorylation dépendante de la PKA ou de la CaMKII. L'inhibition de la calcineurine s'accompagne également d'une stimulation de l'activité de l'IP₃R1, suggérant que la phosphorylation par la PKC est activatrice (Cameron et al., 1995; Bandyopadhyay et al., 2000; Poirier et al., 2001). Finalement, la phosphorylation de l'IP₃R1 par la PKC est inhibée par le calcium et la CaM liée au calcium (Vermassen et al., 2004a). Ainsi, la phosphorylation de l'IP₃R1 par la PKC activerait le récepteur, cet effet pouvant être contré par le calcium, via la calcineurine ou la CaM, ce qui pourrait participer à l'inhibition du canal après relargage du calcium.

En revanche, il semble que les isoformes 2 et 3 de l'IP₃R soient au contraire inhibées consécutivement à une phosphorylation par la PKC. En effet, l'activation de la PKC dans des cellules contenant principalement l'IP₃R2 ou l'IP₃R3 aboutit à une diminution de l'activité de l'IP₃R en réponse à l'IP₃ (Arguin et al., 2007; Caron et al., 2007). Ces différents effets de la PKC peuvent certainement être attribués au fait que les sites potentiels de phosphorylation par la PKC sont différents entre l'IP₃R1 et les deux autres isoformes (Patel et al., 1999). Ainsi,

selon les isoformes d'IP₃R exprimées l'activation de la PLC, en générant de l'IP₃ et du DAG, pourra générer des signaux calciques bien distincts via la régulation de la phosphorylation de l'IP₃R par la PKC.

2.6 Implications de l'IP₃R dans le développement et la vie adulte : contribution de la génétique chez la souris

Le calcium est un second messager polyvalent impliqué dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires. À ce titre l'IP₃R joue donc des rôles importants à l'échelle de l'organisme dont certains ont pu être mis en évidence par la génération de souris invalidées pour les différentes isoformes de l'IP₃R.

2.6.1 Knockout de l'IP₃R1

L'analyse des souris knockout pour l'IP₃R1 suggère que cette isoforme du récepteur est essentielle pour la formation et le fonctionnement du système nerveux central. Ceci est cohérent avec le fort taux d'expression de l'IP₃R1 dans ce tissu. Ainsi, la plupart des souris *ip3r1*^{-/-} meurent *in utero* et les animaux qui naissent souffrent d'ataxie et d'épilepsie sévères conduisant à la mort des nouveau-nés pendant la période de sevrage (Matsumoto et al., 1996). L'IP₃R1 semble également jouer un rôle dans la plasticité neuronale. En effet, dans le cortex cérébelleux des souris déficientes pour l'IP₃R1, les phénomènes de dépression et de potentialisation à long-terme, qui sont des éléments clés de la plasticité synaptique, sont dérégulés (Inoue et al., 1998; Fujii et al., 2000; Nishiyama et al., 2000). Finalement, des neurones où l'IP₃R1 est inactivé présentent un défaut d'extension des neurites. L'IP₃R1 semble particulièrement important pour le guidage des neurites puisque son inactivation spécifiquement dans le cône de croissance provoque l'arrêt de la croissance des neurites et leur rétractation (Takei et al., 1998).

2.6.2 Double Knockout IP₃R2 et IP₃R3

Le simple knockout de l'IP₃R2 ou de l'IP₃R3 ne semble pas produire de phénotype particulier, mettant en évidence une redondance fonctionnelle des isoformes de l'IP₃R en dehors du système nerveux. En revanche, le double knockout de l'IP₃R2 et 3 a permis de montrer que ces 2 isoformes sont essentielles pour la sécrétion exocrine. En effet, les souris double knockout meurent de faim 1 mois après la fin de la période de sevrage car elles sont dans l'incapacité de se nourrir de nourriture sèche alors qu'un régime à base de nourriture prémâché leur permet de survivre (Futatsugi et al., 2005). Les auteurs ont pu montrer que ceci

est dû à un défaut de sécrétion de salive causé par une diminution du relargage de calcium dans les cellules de la glande salivaire. Ces souris présentent également des anomalies pancréatiques. Ainsi, les cellules acineuses contiennent une quantité anormalement élevée de vésicules de sécrétion. L'export des vésicules nécessite normalement une augmentation de la concentration de calcium cytosolique et en absence d'IP₃R les enzymes de la digestion ne peuvent donc plus être sécrétées (Futatsugi et al., 2005).

2.6.3 Double Knockout IP₃R1 et IP₃R2

Le double knockout de l'IP₃R1 et de l'IP₃R2 provoque la mort *in utero* de tous les embryons à 11,5 jours de développement. Cette mortalité est provoquée par des défauts de formation du ventricule du myocarde et par un canal atrio-ventriculaire (Uchida et al., 2010). Ces malformations cardiaques ne sont pas présentes chez les embryons knockout pour l'une ou l'autre de ces isoformes de l'IP₃R. Les auteurs ont pu montrer que ces défauts du développement cardiaques sont provoqués par l'absence d'activité du facteur de transcription NFAT. Cette protéine est normalement activée par la calcineurine (Uchida et al., 2010). Ainsi, en l'absence d'IP₃R1 et 2, la voie calcineurine/NFAT ne peut plus être activée dans l'embryon ce qui conduit à des malformations cardiaques. Les souris déficiente pour NFAT ou pour la calcineurine présentent d'ailleurs elles aussi des malformations cardiaques (Ranger et al., 1998; Graef et al., 2001).

3 LE POISSON ZÈBRE

Le poisson zèbre (*Brachydanio rerio*, ou *Danio rerio*) est un poisson téléostéen tropical d'eau douce, appartenant à la famille des *cyprinidae*. Il a été initialement décrit au début du XIX^{ème} siècle, par Francis Hamilton, un chirurgien de la compagnie anglaise des Indes de l'Est. Ce poisson est originaire des rivières de l'est de l'Inde et se développe dans des eaux tempérées avoisinant les 25°C. Il tient son nom de son apparence zébrée de rayures aux reflets bleutés et argentés (**Figure 25**). A l'âge adulte, le poisson zèbre mesure environ 4 cm et présente un dimorphisme sexuel.

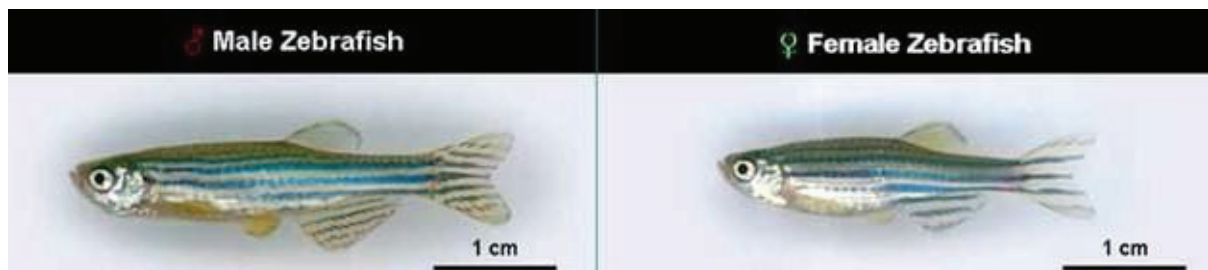


Figure 25 : Le modèle du poisson zèbre

Le poisson zèbre adulte se caractérise par les bandes colorées présentes le long de l'axe antéro-postérieur. La femelle du poisson zèbre se distingue du mâle par un abdomen gonflé.

Il est utilisé en biologie du développement depuis plus de 70 ans mais véritablement en modèle biologique depuis une trentaine d'années grâce aux travaux pionniers de George Streisinger et, plus tard, de Charles Kimmel. Ce modèle vertébré possède de nombreux avantages morphologiques, physiologiques et génétiques qui font, de nos jours du poisson zèbre l'un des modèles vertébrés les plus utilisés dans les domaines de l'embryologie, la physiologie, la neurobiologie et la recherche biomédicale.

3.1 Les avantages du modèle du poisson zèbre

3.1.1 Les avantages liés à la biologie du poisson zèbre

Le poisson zèbre possède une fécondation externe permettant l'accès et l'observation rapide des embryons dès la première étape du développement embryonnaire. Durant les deux premiers jours de développement, l'embryon est transparent ce qui permet l'observation rapide et précise du suivi de la mise en place de chaque tissu et de chaque organe, tels que le cœur, le cerveau, les yeux ou les somites. De plus, son développement est extrêmement rapide

comparé à la plupart des autres espèces de vertébrés. En effet, environ 5 heures après la fécondation (5 hpf), les feuilletts embryonnaires commencent à se mettre en place, à 10 hpf le premier somite est formé et à 24 hpf l'œuf s'est développé en une larve possédant une tête et une queue complètement individualisées.

Enfin, outre sa maintenance aisée en aquarium grâce à sa petite taille et à sa robustesse, l'un des principaux avantages de ce modèle est l'abondance du « matériel biologique » qu'il fournit, une femelle pouvant pondre jusqu'à 200 œufs par jour.

En plus de ces qualités physiologiques et morphologiques, le poisson zèbre présente des avantages génétiques indéniables. En effet, contrairement aux autres poissons qui peuvent être triploïdes ou tétraploïdes, ce dernier est diploïde. Son génome de 1,6 Gb, composé de 25 paires de chromosomes est entièrement séquencé. Au cours de l'évolution, 20% de son génome s'est dupliqué aboutissant à la présence de gènes sous plusieurs copies. Cependant, la plupart du temps, il n'y a pas de redondance fonctionnelle et les produits de ces duplications se répartissent la fonction qui est normalement assurée par une seule protéine chez les vertébrés.

3.1.2 Les connaissances du modèle et les banques de données

Le poisson zèbre s'est imposé comme un modèle d'étude incontournable du développement précoce grâce à la mise en place de bibliothèques de mutants. La première a été créée par l'équipe du Dr Nüsslein-Volhard en 1996 et a abouti à l'obtention de 1163 mutants par mutagenèse dirigée (Haffter and Nüsslein-Volhard, 1996). Cette banque de mutants correspond d'ailleurs à la première créée chez un organisme vertébré. Il est aussi important de souligner l'importante contribution apportée par l'équipe de Mary Mullins qui a généré une banque de gènes maternels mutants (Dosch et al., 2004; Wagner et al., 2004a). Cette bibliothèque particulière a permis l'étude des gènes exclusivement maternels qui ont une fonction au cours de l'ovogénèse et des premiers stades du développement du poisson zèbre. De plus, une banque de profils d'expression de nombreux gènes au cours du développement a été réalisée par hybridation *in situ* systématique de clones EST (Thisse et al., 2004). Ces données, ainsi que de nombreuses autres informations, sont répertoriées sur un site internet dédié au poisson zèbre, ZFIN (The Zebrafish International Network) : www.zfin.org.

3.2 La génétique moléculaire chez le poisson zèbre

Il existe de nos jours un large choix de méthodes permettant de moduler l'expression d'un gène afin d'étudier son rôle. Dans cette partie, ne sera traitée qu'une partie des

techniques à notre disposition (pour les autres, voir (Skromne and Prince, 2008; Lawson and Wolfe, 2011)).

3.2.1 Les stratégies d'invalidation

Des oligonucléotides synthétiques ont été largement utilisés pour étudier la fonction d'une protéine donnée au cours du développement du poisson zèbre. Ces oligonucléotides ciblent les ARNm maternels et zygotiques pour induire une dégradation enzymatique du transcrit ou bloquer stériquement les sites d'initiation de la transcription. Des oligomères antisens peuvent aussi spécifiquement cibler des ARNm par appariement entre bases afin d'épisser les jonctions et de compromettre le processus de synthèse de l'ARNm. Cette dernière approche peut être utilisée pour insérer des introns ou éliminer des exons, ce qui aboutit généralement à un décalage du cadre de lecture et à l'introduction de codons stop (Morcos, 2007).

Dans le modèle du poisson zèbre, la technique d'invalidation la plus utilisée est celle dite des morpholinos (MO). Les morpholinos sont des oligonucléotides modifiés dont la chaîne phosphate-sucre a été remplacée par des morpholines liées entre elles par des groupements phosphorodiamidates afin d'augmenter leur stabilité *in vivo* tout en maintenant leur faculté à cibler l'ARNm cible. Cette stratégie antisens a pour avantage la nature stable et résistante aux nucléases des morpholinos. L'injection dans le vitellus au stade une à huit cellules de ces oligonucléotides dirigés spécifiquement contre une cible donnée, permet de bloquer efficacement la traduction de l'ARNm correspondant dans chacune des cellules de l'embryon. L'efficacité du morpholino est généralement de 3 jours mais peut persister à 5 jours dans certains cas, permettant l'exploration de la fonction du gène cible au cours du développement précoce (Nasevicius and Ekker, 2000). Cependant, l'une des limitations les plus importantes de cette stratégie est la présence de phénotypes non spécifiques « hors-cibles » obtenus après injection de certaines séquences. L'effet majeur de ces effets hors-cibles dépend de l'activation de p53 aboutissant à une augmentation des cellules anormales et apoptotiques dans les cellules neurales et les somites (Robu et al., 2007). Le mécanisme d'activation de p53 reste toujours mal compris mais environ 20 % des séquences de morpholinos induisent des phénotypes hors-cibles. Ces effets hors-cibles sont efficacement diminués par la co-injection d'un morpholino dirigé contre p53.

Une alternative aux MOs, bien que moins courante, est l'utilisation d'oligomères polyamides chargés négativement (ncPNA) (Urtishak et al., 2003). Comme les MOs, les ncPNA peuvent être injectés dans le vitellus des embryons de poisson zèbre et présentent des distributions

tissulaires similaires. Bien que les ncPNA s'hybrident plus facilement sur l'ARN cible, ils sont aussi beaucoup moins stables *in vivo* du fait des liaisons amides de ces oligonucléotides synthétiques.

Une minorité de chercheurs continuent à utiliser les fragments d'ARN double brin pour induire des phénotypes mutants dans le poisson zèbre (Hsieh and Liao, 2002). L'utilisation d'ARN interférence pour étudier le développement du poisson zèbre est toutefois problématique. En effet, des embryons injectés avec de l'ARN double brin contre un transgène GFP présentent de sévères anomalies de développement (Zhao et al., 2001). De plus, il a été montré que les ARN double brin contre *spadetail*, *dharma* and *ntla* entraînent une dégradation non spécifique de l'ensemble des ARNs dans l'embryon (Oates et al., 2000).

3.2.2 Les stratégies de mutagenèse

Les différents avantages du modèle du poisson zèbre en font un outil idéal pour le criblage de mutants obtenus par mutagenèse ENU (N-éthyl-N-nitrosourea). Cette technique consiste à traiter un mâle avec un agent mutagène, l'ENU, puis de le croiser avec une femelle au phénotype sauvage. Les deux premières générations sont hétérozygotes tandis que la génération F3 est alors constituée d'embryons homozygotes pour une mutation particulière (mais aléatoire au sein du génome) (Lieschke and Currie, 2007). Cette technique permet donc la création de bibliothèques de mutants utilisés ensuite en génétique classique ou inverse.

Les techniques de génétique classique consistent à identifier les gènes impliqués dans un processus biologique aboutissant à l'obtention d'un phénotype particulier, par l'analyse (ou screen) d'une population de mutants contenant des mutations aléatoires, obtenues généralement par la mutagenèse ENU. Les allèles porteurs de la lésion sont identifiés par l'étude minutieuse du phénotype suivi d'un génotypage de l'allèle (Lawson and Wolfe, 2011). Les limites de la génétique classique telles que la taille et la duplication du génome, le temps... ne permettent pas d'identifier tous les gènes impliqués dans le développement.

Depuis une dizaine d'années des techniques de génétique inverse visant à identifier directement les fonctions d'un gène cible se sont développées.

La première approche de génétique inverse utilisée sur le poisson zèbre et, qui a permis, à partir de poisson muté par ENU, de muter un gène cible est la technique du TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes). Cette technique consiste à sacrifier les mâles F1, obtenus par le protocole de la mutagenèse ENU, et de cryopréserver des échantillons de sperme de chaque individu ainsi que d'analyser leur ADN génomique. Cette analyse permet d'identifier de possibles lésions portées par un gène d'intérêt. Après identification d'une

lésion, une génération F2 est générée en utilisant le sperme du mâle correspondant jusqu'à obtenir en génération F3 25 % d'individus homozygotes (Wienholds et al., 2003; Kettleborough et al., 2011).

D'autres équipes utilisent la mutagenèse par l'intermédiaire d'un rétrovirus ou d'un transposon (Gaiano et al., 1996; Amsterdam and Hopkins, 2003). Ces méthodes sont beaucoup moins efficaces que l'utilisation de produits chimiques mais présentent l'avantage d'identifier plus simplement les gènes mutés grâce aux « tags » marquant chaque événement d'insertion.

3.2.3 Les stratégies d'ingénierie génomique

Les approches d'ingénierie du génome permettent la modification spécifique et ciblée du génome dans des organismes vivants. Cette modification peut être réalisée à l'aide de nucléases induisant des cassures double brins de l'ADN. Ces cassures de l'ADN sont réparées par le système de jonction d'extrémités non homologues qui introduit régulièrement des délétions ou des insertions au niveau du site de clivage aboutissant alors à un décalage du cadre de lecture et donc à une invalidation du gène cible. Il existe actuellement trois principales approches permettant de cibler les nucléases à un locus donné sur l'ADN.

La première approche dite des nucléases à doigts de zinc (ZFNs, Zinc Finger Nucleases) utilise des protéines à doigt de zinc (ZFP, Zinc Finger Protein) d'environ 30 acides aminés qui reconnaissent spécifiquement 3 pb d'ADN grâce à la présence de résidus clés à leur surface. Les ZFNs contiennent entre 3 et 6 ZFPs assurant ainsi la reconnaissance de 9 à 18 pb et permettant alors leur liaison spécifique sur un site cible. Dans les ZFNs, ces ZFPs sont couplées au domaine de clivage de l'endonuclease FokI responsable de la cassure double brins de l'ADN (Urnov et al., 2010). Cependant, cette nucléase requiert de se dimériser pour cliver l'ADN. Ainsi, cette technique nécessite l'utilisation d'un couple de ZFNs qui doivent se fixer de part et d'autre du site à cliver pour permettre la dimérisation de FokI. Cette technique a été initialement utilisée pour modifier des génomes entiers d'animaux, en particulier celui de la drosophile (Bibikova et al., 2002) et a été, depuis, adapté au poisson zèbre. Dans ce modèle, une paire de ZFNs est élaborée puis les ARNm correspondant sont injectés dans les embryons au stade 1 cellule et vont ainsi générer une lésion au niveau du locus génomique, avant d'être transmise à toute la lignée (Doyon et al., 2008).

La deuxième approche, dite des TALENs (Transcription activator-like effector nuclease), est assez similaire à celle des ZFN dans la mesure où elles utilisent également des protéines se liant à l'ADN, les TALEs (Transcription activator-like effector), couplées au

domaine de clivage de l'endonucléase FokI. Les TALEs sont des protéines issues d'une bactérie pathogène des plantes contenant des domaines répétés de reconnaissance de l'ADN chacun ciblant spécifiquement un nucléotide grâce à la présence de deux acides aminés variables dans le domaine de liaison à l'ADN (Gaj et al., 2013). Ainsi l'association de plusieurs domaines de reconnaissance de l'ADN des TALEs permet une liaison spécifique des TALENs sur une région cible de l'ADN. De la même façon que pour les ZFNs, un couple de TALENs est utilisé pour réaliser une cassure double brins à un locus cible du génome. Cette technique a été utilisée récemment pour invalider différents gènes chez le poisson zèbre grâce à l'injection d'ARNm codant pour des couples de TALENs (Huang et al., 2011; Sander et al., 2011; Cade et al., 2012).

Finalement, la dernière approche est celle dite du système CRISPR (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat)/Cas (CRISPR associated). Chez les bactéries le système CRISPR/Cas semble procurer un mécanisme de d'immunité acquise contre les ADN étrangers tels que ceux des virus ou des phages. Les CRISPR sont des séquences contenant des éléments répétés entre lesquels s'insèrent des séquences provenant d'ADN étrangers. La transcription de ces séquences suivi du découpage et de la réorganisation de l'ARN permet la reconnaissance de séquence cible sur un ADN exogène ainsi que son invalidation grâce à l'intervention des protéines Cas qui sont associées aux CRISPR. Il existe trois systèmes CRISPR/Cas et celui de type II fait intervenir l'endonucléase Cas9 qui provoque une cassure double brins de l'ADN cible (Gaj et al., 2013). Ainsi, en créant des séquences CRISPR ciblant un gène donné ce système a pu être utilisé pour invalider des gènes dans des cellules en culture (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013) mais aussi dans des embryons de poissons zèbres (Chang et al., 2013; Hwang et al., 2013; Xiao et al., 2013).

Il faut également noter que ces techniques faisant intervenir des cassures double brins de l'ADN peuvent également être utilisées pour insérer une séquence d'intérêt à un locus donné du génome puisque ces cassures de l'ADN semblent favoriser la recombinaison homologue. Ainsi, en apportant un fragment d'ADN à insérer en même temps que les composants permettant le clivage de l'ADN, ces techniques permettent l'insertion d'une séquence dans le génome. Cette approche a été utilisée avec succès chez le poisson zèbre (Bedell et al., 2012; Chang et al., 2013).

3.3 Le développement embryonnaire du poisson zèbre

3.3.1 La période de clivage

Après la ponte, les œufs sont entourés d'une membrane protectrice appelée le chorion. L'œuf possède une réserve importante de nutriments appelée vitellus ou sac vitellin (yolk). Comme d'autres espèces de deutérostomiens, la fécondation de l'œuf du poisson zèbre induit une vague calcique qui se propage dans tout l'embryon et active des cascades de signalisations en aval (Lee et al., 1999a). Ce relargage calcique provoque notamment une contraction du cytosquelette d'actine de l'œuf et repousse le cytoplasme non vitellin au pôle animal. Cette ségrégation du cytoplasme donne naissance au blastodisque (stade une cellule) au pôle animal de l'embryon (Leung et al., 2000). Le blastodisque va être l'objet de nombreuses divisions. Ces divisions sont méroblastiques, c'est-à-dire qu'elles conduisent à une scission incomplète des cytoplasmes permettant les divisions cellulaires uniquement au niveau du pôle animal (**Figure 26**). Durant la période de clivage, les dix premières divisions cellulaires sont synchronisées et se déroulent toutes les 15 minutes. Ce processus augmente rapidement le nombre de cellules (les blastomères) et conduit à la formation du blastoderme. Les cellules situées à la marge communiquent avec le vitellus ce qui permet le transit des nutriments et des facteurs morphogénétiques du vitellus jusqu'au pôle animal. Cette fonction des ponts cytoplasmiques avait été initialement suggérée, mais récemment ces phénomènes ont été observés et confirmés *in vivo* (Olivier et al., 2010).

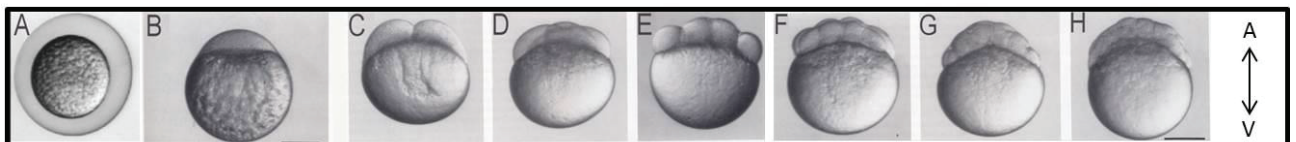


Figure 26 : Période de clivage

Après fécondation, le blastodisque se forme pour donner un embryon avec une cellule (B). Des divisions rapides se produisent jusqu'au stade 64 cellules (H).

3.3.2 La période de blastulation

Au stade 128 cellules, le blastoderme acquiert une forme sphérique (2,25 hpf), on parle alors de blastula. À ce stade, seuls les gènes maternels sont exprimés, et ce n'est qu'à partir de la 10^{ème} étape de division (1024 cellules, 3 hpf) que les gènes zygotiques commencent à être exprimés. Cette période est appelée la transition mi-blastula (MBT, Mid-Blastula Transition). On observe aussi un ralentissement des divisions cellulaires qui

deviennent désynchronisées et les premiers mouvements cellulaires apparaissent (Kane and Kimmel, 1993).

A la MBT, trois populations cellulaires se mettent en place (**Figure 27**) :

- 1) les cellules de la couche externe du blastoderme qui s'allongent et s'affinent au cours de la blastulation pour former une enveloppe appelée l'EVL (Enveloping Layer). Ces cellules sont interconnectées par des jonctions serrées.
- 2) Les cellules rondes situées entre l'EVL et la couche syncytiale vitelline forment la couche des cellules profondes (DCL, Deep Cell Layer).
- 3) La couche syncytiale vitelline (YSL, Yolk Syncytial Layer) résulte de la fusion des blastomères reposant sur le vitellus avec le cytoplasme vitellin (Kimmel and Law, 1985). Les blastomères en fusionnant relarguent leur contenu dans le vitellus dont leurs noyaux (YSN, Yolk Syncytial layer Nuclei). Au moment de la formation du YSL, les YSN forment une ceinture à la périphérie de la marge des blastomères. Ces noyaux continuent de se diviser 3 à 5 fois de façon asynchrone et deviennent post-mitotiques juste avant le début de la gastrulation. Avec la formation du YSL, le vitellus devient une région avec une forte activité transcriptionnelle et de signalisation notamment grâce à l'existence de jonctions communicantes avec les blastomères sus-jacents.

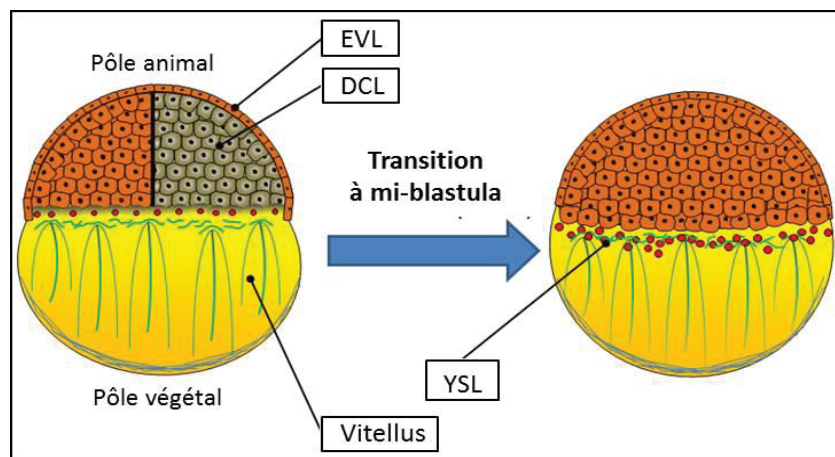


Figure 27 : La transition à mi-blastula (MBT)

À ce stade, l'expression des gènes zygotiques débutent et la couche syncytiale vitelline (YSL) est formée par fusion des blastomères marginaux avec le vitellus. Après la MBT, l'embryon est composé de trois couches de cellules, la couche enveloppante (EVL), la couche de cellules profondes (DCL) et la couche syncytiale vitelline (YSL)

3.3.3 La période de gastrulation

La gastrulation est une étape du développement embryonnaire au cours de laquelle une série de mouvements morphogénétiques aboutit à la formation des feuilletts embryonnaires et à l'établissement des axes de symétries du futur corps adulte.

3.3.3.1 L'épibolie

Le premier mouvement morphogénétique se produisant au cours de la gastrulation est l'épibolie. Ce mouvement se caractérise par le recouvrement du vitellus par le blastoderme avec les trois couches cellulaires de l'embryon qui migrent vers le pôle végétal. L'épibolie se divise en deux phases : l'initiation et la progression (Betchaku and Trinkaus, 1978).

L'initiation de l'épibolie se produit entre le stade sphère (4 hpf) et le stade dôme (4,3 hpf). Au stade sphère, le blastoderme est comprimé et l'interface entre le blastoderme et le vitellus s'aplatit rendant l'embryon sphérique. Peu après le YSL se contracte entraînant un déplacement de certains noyaux vers le centre de l'embryon qui forment alors le YSL interne (iYSL) situé sous les cellules profondes. Le YSL à la marge de l'EVL constitue alors le YSL externe (eYSL). À ce moment, la formation du dôme s'initie avec l'iYSL qui exerce une poussée en direction du pôle animal entraînant une intercalation radiale des cellules profondes et le changement de forme du blastoderme qui s'incurve pour former un dôme (**Figure 28**).

La progression de l'épibolie débute alors. Durant cette phase les stades de développement sont définis par le pourcentage du vitellus recouvert par le blastoderme. Les trois couches cellulaires migrent au cours de l'épibolie et il semble que l'eYSL joue un rôle fondamental car il est capable de réaliser l'épibolie même en l'absence du blastoderme (Trinkaus, 1951). L'EVL est liée à l'eYSL par des jonctions serrées et semble donc entraînée par ce dernier. De plus, la poussée de l'iYSL et l'intercalation radiale des cellules profondes, de l'intérieur vers l'extérieur de l'embryon, continuent, favorisant la migration de la DCL vers le pôle végétal ainsi que l'amincissement de cette couche de cellules (Warga and Kimmel, 1990). Jusqu'à 50% d'épibolie les trois couches cellulaires migrent conjointement mais une fois l'équateur de l'embryon atteint les cellules profondes stoppent temporairement l'épibolie pour initier les autres mouvements morphogénétiques, c'est là que commence la gastrulation à proprement parler (**Figure 28**). Après 50% d'épibolie la marge du blastoderme commence à se contracter pour aboutir à la fermeture du blastopore à la fin de l'épibolie. À la fin de l'épibolie, l'embryon atteint le stade bourgeon (bud stage, 10 hpf) où les ébauches de la tête et la queue sont visibles.

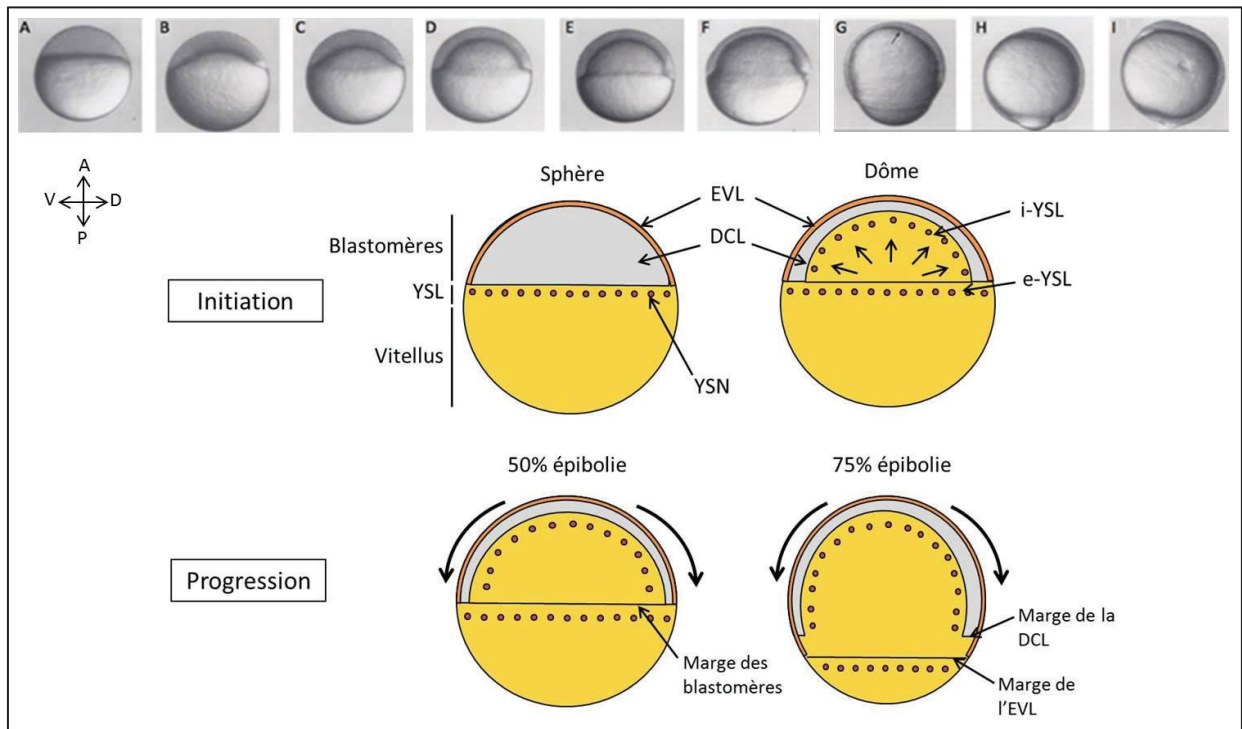


Figure 28 : Le mouvement d'épibolie

L'épibolie débute par une période d'initiation entre le stade sphère (A) et le stade dôme (B) et se caractérise par un amincissement de la DCL. Ensuite l'épibolie progresse pour assurer le recouvrement du vitellus par le blastoderme (C-H) et se termine au stade « bud » (I). À 50% d'épibolie les cellules profondes s'arrêtent pour effectuer d'autres mouvements morphogénétiques ce qui aboutit à un décalage entre l'EVL et la DCL dans les étapes plus tardives de l'épibolie.

3.3.3.2 L'involution

Lorsque le blastoderme a recouvert environ la moitié du vitellus (stade 50% d'épibolie, 5,25 hpf), les cellules profondes arrêtent l'épibolie et débutent l'involution. Des blastomères marginaux commencent par s'internaliser entraînant un épaississement du blastoderme, appelé « germ ring » (5,7 hpf), au futur pôle dorsal de l'embryon. L'internalisation se poursuit ensuite tout le long de la marge. En s'internalisant les blastomères donnent naissance à deux couches cellulaires superposées : l'épiblaste (la plus externe) qui formera l'ectoderme et l'hypoblaste qui formera le mésoderme et l'endoderme (**Figure 29**). L'épiblaste continue ensuite l'épibolie alors que l'hypoblaste subit une involution et s'étend alors vers le pôle animal.

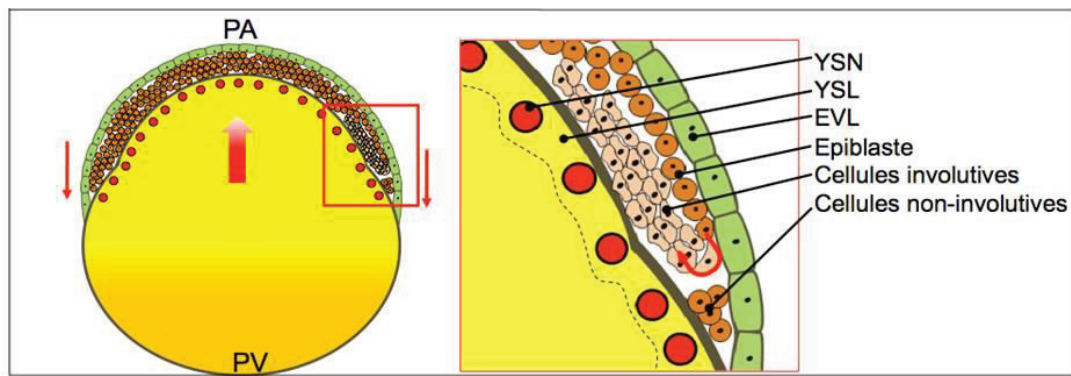


Figure 29 : Le mouvement d'involution

À 50% d'épibolie les cellules profondes commencent à s'involver donnant naissance à l'épiblaste et à l'hypoblaste (cellules involutives) et provoquant un épaissement de la future région dorsale de l'embryon.

3.3.3.3 Les mouvements de convergence et d'extension

Consécutivement, des mouvements de convergence, correspondant au recrutement des cellules ventrales du côté dorsal de l'embryon débutent. Ces mouvements dirigés dans le sens ventro-dorsal entraînent un amincissement du blastoderme côté ventral au profit de l'axe dorsal. Une structure plus épaisse et formant une demi-sphère apparaît alors du côté dorsal de l'embryon, elle est nommée bouclier (« shield »). Le bouclier est le siège du centre organisateur de l'axe dorsal (équivalent au centre de Spemann-Mangold chez le xénope). Dans le même temps, les mouvements d'extension, consécutif à l'involution, favorisent l'accumulation du blastoderme vers le pôle antérieur (plus précocement le pôle animal) de l'embryon grâce à la migration des cellules vers ce pôle. De plus, l'axe antéro-postérieur s'allonge du fait de l'intercalation radiale des cellules mésodermes le long de cet axe (**Figure 30**).

Les mouvements de convergence et d'extension sont donc les principaux responsables de l'établissement des axes embryonnaires au cours de la gastrulation en permettant un resserrement de l'axe dorso-ventral par la migration des cellules mésodermes vers le futur pôle dorsal (convergence) et une elongation de l'axe antéro-postérieur par leur intercalation avec les cellules voisines (extension) (Solnica-Krezel, 2006). Une étude menée par Glickman et collaborateurs a montré de façon surprenante que les mouvements d'extension peuvent se dérouler en l'absence des mouvements de convergence (Glickman et al., 2003). Ces mouvements de convergence et d'extension sont indispensables pour la bonne mise en place des axes embryonnaires (Myers et al., 2002b; Sepich et al., 2011) et il est important de noter

qu'une dérégulation de ces mouvements morphogénétiques entraîne des défauts dans la formation de la notochorde (Glickman et al., 2003; Yin and Solnica-Krezel, 2007).

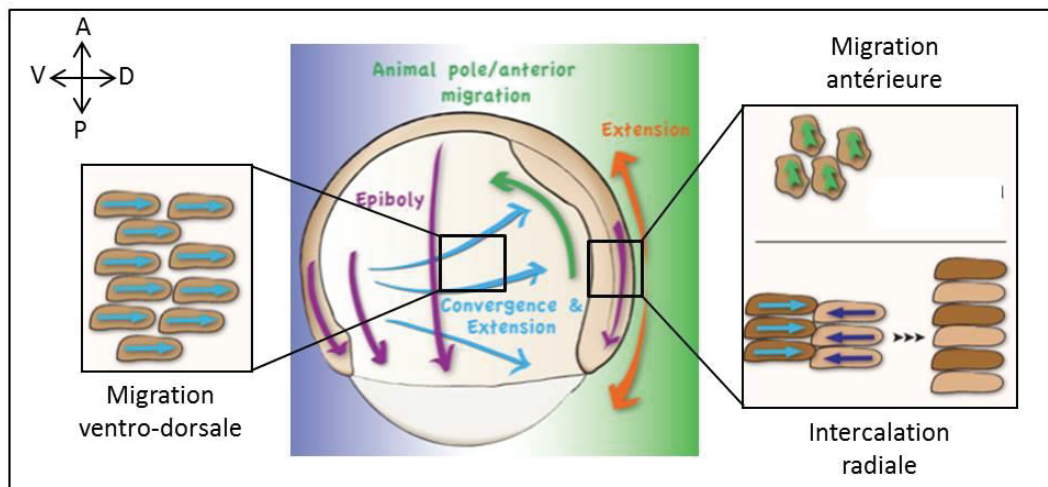


Figure 30 : Mouvements de convergence et d'extension

Au cours de la gastrulation, les mouvements de convergence se caractérisent par la migration ventro-dorsale des blastomères de la DCL. Les mouvements d'extension se produisent au pôle dorsal de l'embryon où les cellules migrent vers le pôle antérieur et s'intercalent entre elles pour allonger l'axe antéro-postérieur (d'après Yin and Solnica-Krezel, 2007).

3.3.4 La période de la segmentation

Une fois la gastrulation achevée, les trois feuillets embryonnaires sont en place et au cours de la période suivante dite de segmentation de nombreux mouvements morphogénétiques ont lieu aboutissant à l'ébauche des premiers organes et à l'élongation de l'embryon.

Chez le poisson zèbre, la neurulation et la segmentation se produisent conjointement. Ce qui était l'épiblaste au cours de la gastrulation est maintenant différencié en ectoderme. Cette ligne dorsale s'allonge au cours de la période de segmentation par incorporation de cellules ventrales qui continuent à effectuer des mouvements de convergence (**Figure 31**). Le long de l'axe dorsal on retrouve notamment la crête neurale qui va se différencier en tube et en crête neural au cours de la période de segmentation. Juste sous le tube neural une structure en forme de tige flexible, la notochorde, est formée au cours de la segmentation (**Figure 31**). La notochorde est une lamelle cartilagineuse d'origine mésodermique qui joue un rôle crucial lors de l'embryogénèse, dans la protection du tube neural mais aussi dans le maintien du cytosquelette chez les chordés. (Chez les vertébrés, la notochorde régresse généralement à l'âge adulte pour être remplacée par la colonne vertébrale). La notochorde est formée par

l'intercalation cellulaire lors des mouvements de convergence et d'extension des cellules mésodermes axiales, qui aboutit à la formation d'une longue structure fibreuse et vacuolisée (Glickman et al., 2003). Il est intéressant de noter que des cellules apoptotiques sont présentes le long de la notochorde à partir de 14 hpf (Cole and Ross, 2001). Les somites, d'origine mésodermique, sont édifiés de part et d'autre du tube neural et de la notochorde et leur formation progresse dans le sens antéro-postérieur (**Figure 31**). Ces structures se forment par paire à partir de 10 hpf, au rythme de trois par heure pour les six premières paires et de deux par heure pour les suivantes (Kimmel et al., 1995). Les somites sont constitués du myotome, à l'origine de la formation des muscles, et du sclérotome, précurseur des tissus squelettiques et notamment du cartilage.

Dans la partie antérieure de l'embryon l'ébauche de l'œil se met en place et le cerveau apparaît au fur et à mesure, formé de quatre parties distinctes : le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. La formation progressive du système nerveux et l'établissement des premiers muscles aboutissent aux premiers mouvements de l'embryon vers le stade 20 somites (19 hpf). La segmentation, se terminant aux alentours de 23 hpf, donnant un embryon possédant de 30 à 34 paires de somites.

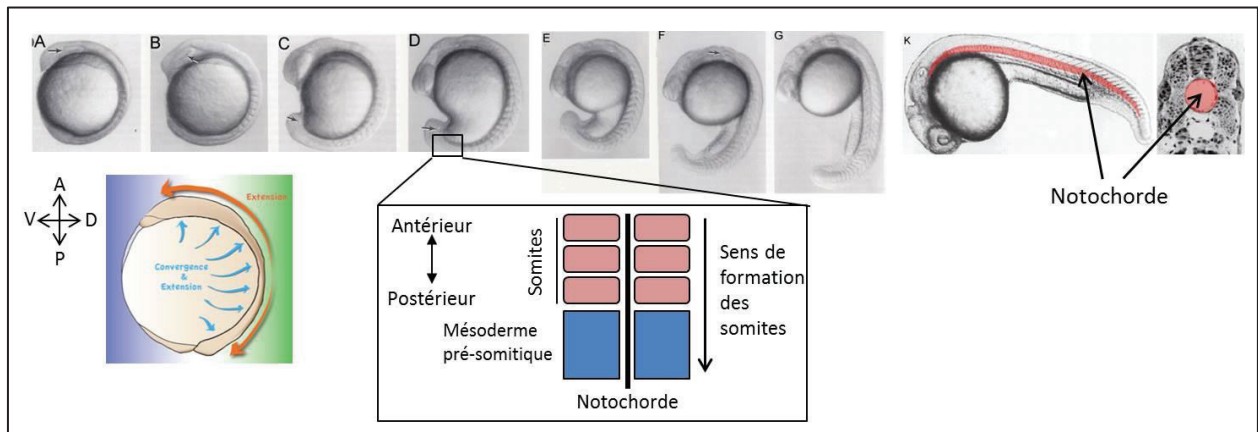


Figure 31 : Période de segmentation

Au cours de cette période, l'axe antéro-postérieur continue de s'allonger grâce à des mouvements de convergence et d'extension. La notochorde est formée et de part et d'autre de cette structure les somites apparaissent dans le sens antéro-postérieur.

3.3.5 La période de pharyngula

La formation du cœur et l'apparition des premières cellules sanguines se font pendant la période de pharyngula. Conjointement, l'embryon présente un allongement important au

niveau de la queue qui s'estompe aux environs de 30 hpf. Ceci s'accompagne du processus de pigmentation des mélanophores de la peau et de l'épithélium rétinien. Les ébauches des nageoires pectorales apparaissent vers la fin de cette période (42 hpf).

3.3.6 La période d'éclosion

A cette période, l'embryon possède tous les organes vitaux lui permettant de vivre en autonomie. Ce 3^{ème} jour de vie est réservé, pour une grande part, au développement du squelette aboutissant à l'apparition de condensations mésenchymateuses à l'origine du cartilage des nageoires pectorales et de la mâchoire.

3.4 Mécanismes moléculaire de la gastrulation

3.4.1 Mécanismes de l'épibolie

Les mécanismes moléculaires contrôlant la progression de l'épibolie sont encore assez flous. En revanche, le YSL apparait comme un acteur essentiel de l'épibolie dans la mesure où il est capable de réaliser l'épibolie en absence de blastoderme. Le YSL semble donc à même d'entraîner le blastoderme au cours de l'épibolie pour le diriger vers le pôle végétal de l'embryon. Ainsi, les cellules de l'EVL forment des jonctions serrées avec l'eYSL comme en atteste la présence de ZO-1 et Claudin E, deux protéines spécifiques de ce type de jonction, à l'interface entre ces deux couches cellulaires (**Figure 32**) (Köppen et al., 2006). Plus récemment, il a d'ailleurs été montré que l'invalidation de Claudin E par injection d'un morpholino ralentit significativement l'épibolie de l'EVL (Siddiqui et al., 2010). L'adhésion entre cellules semble également être un élément important de l'épibolie de l'EVL et de la DCL. En effet, l'invalidation de la E-Cadhérine, une protéine clé des jonctions adhérentes, perturbe l'épibolie (Babb and Marrs, 2004). Il a par la suite été montré que la E-Cadhérine est en fait un composant essentiel de l'interaction entre les cellules de l'EVL et celles de la DCL puisque son invalidation par un morpholino stoppe l'épibolie de la DCL sans affecter celle de l'EVL ou du YSL (Shimizu et al., 2005). De plus, des embryons portant une mutation sur le gène codant pour la E-Cadhérine présentent un défaut d'intercalation des cellules de la DCL aboutissant à un ralentissement de l'épibolie de cette couche cellulaire (Kane et al., 2005). Le même effet est par ailleurs observé lors de l'invalidation de l' α E-Caténine, une protéine associée à la E-Cadhérine dans les jonctions adhérentes (Schepis et al., 2012). Au niveau de l'EVL, la protéine EpCAM est importante pour assurer l'adhésion cellule/cellule mais aussi pour l'interaction avec les cellules de la DCL et son invalidation se traduit par un défaut

d'épibolie de l'EVL et de la DCL (Slanchev et al., 2009). Ainsi, les jonctions entre cellules semblent essentielles pour assurer le bon déroulement de l'épibolie. Cependant, cette adhésion cellule/cellule doit également être régulée. En effet, la protéine $G\alpha_{12/13}$ régule négativement la E-Cadhérine mais son invalidation provoque également un défaut d'épibolie suggérant que les jonctions entre cellules doivent être rompues à certains moments de l'épibolie (Lin et al., 2009). De même le facteur de transcription ZEB1 réprime la E-Cadhérine et EpCAM mais semble également requis pour la progression normale de l'épibolie (Vannier et al., 2013). Ainsi, l'adhésion entre cellules au niveau de la DCL et de l'EVL est importante pour permettre l'épibolie de ces deux couches cellulaires mais ce n'est en revanche pas un « moteur » de l'épibolie.

Il a été proposé que l'endocytose de la membrane externe du vitellus puisse participer activement à la progression de l'épibolie (**Figure 32**). En effet, au cours de ce processus, 87% de la membrane externe du vitellus est retirée entre le stade shield et la fin de l'épibolie (Cheng et al., 2004). De plus, une région d'endocytose active a été décrite à l'interface entre l'EVL et le YSL suggérant que cette endocytose pourrait être une « force » permettant l'avancement de l'EVL (Solnica-Krezel and Driever, 1994). Cependant, jusqu'à aujourd'hui cette hypothèse n'a pu être ni vérifiée ni infirmée.

Finalement, la principale force permettant l'épibolie semble provenir du remodelage du cytosquelette de microtubules et d'actine dans le vitellus.

3.4.1.1 Les microtubules

Dans le vitellus, les microtubules s'organisent en un réseau composé d'une structure dense en forme de ceinture liée aux noyaux du YSL d'où émergent un réseau de microtubules alignés selon l'axe animal-végétal le long du vitellus (**Figure 32**). L'observation que ce réseau de microtubules se raccourcit au cours de l'épibolie suggère qu'il pourrait tracter le YSL et donc le blastoderme au cours de ce processus (Solnica-Krezel and Driever, 1994). De plus la perturbation des microtubules par radiations aux UV ou par des traitements chimiques, aussi bien dépolymérisant que stabilisant les microtubules, ralentit considérablement l'épibolie du YSL et dans une moindre mesure celle de l'EVL et de la DCL (Strähle and Jesuthasan, 1993; Solnica-Krezel and Driever, 1994). Plus récemment, il a été montré que la Cyp11a1 (Cytochrome P450, subfamily XIA, polypeptide 1), une enzyme impliquée dans la catalyse du cholestérol en prégnénolone, est importante pour la dynamique des microtubules au cours de l'épibolie (Hsu et al., 2006). Au cours de l'épibolie, l'expression de Cyp11a1 est restreinte au YSL et son invalidation s'accompagne d'un retard d'épibolie de l'EVL et de la

DCL. Les auteurs ont pu montrer que cela est dû à une diminution de la polymérisation des microtubules et il semble que la prégnénolone soit capable de se fixer sur les microtubules dans le vitellus pour maintenir leur abondance bien que le mécanisme reste inconnu (Hsu et al., 2006). De la même façon des embryons invalidés pour le facteur de transcription Eomesodermin A présentent un retard d'épibolie associé à des perturbations dans le réseau de microtubules du vitellus bien qu'ici aussi le lien entre Eomesodermin A et les microtubules reste à caractériser (Du et al., 2012).

3.4.1.2 Les microfilaments d'actine

En plus des microtubules le cytosquelette d'actine joue également un rôle essentiel dans l'épibolie (**Figure 32**). Aux alentours de 40% d'épibolie, il se forme un anneau d'actine et de myosine dans l'eYSL à l'interface avec l'EVL qui se densifie lors de la progression de l'épibolie. Un autre anneau d'actine apparaît également à la marge de la DCL au cours de l'épibolie (Cheng et al., 2004; Köppen et al., 2006; Behrndt et al., 2012). Le blocage de polymérisation de l'actine ou du recrutement de la myosine par des traitements pharmacologiques entraîne un retard sévère d'épibolie (Cheng et al., 2004; Köppen et al., 2006). De façon intéressante la chélation du calcium dans le vitellus perturbe aussi la polymérisation de l'actine suggérant que ce processus est dépendant du calcium (Cheng et al., 2004). La formation de l'anneau d'actine-myosine semble contrôlée par plusieurs facteurs bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas clairement établis. Ainsi, l'invalidation de la kinase Msn-1 perturbe le recrutement de l'actine et de la myosine perturbant l'épibolie (Köppen et al., 2006). En revanche, une mutation de la kinase MAPKAK2 la rendant inactive s'accompagne d'une contraction accrue de l'anneau d'actine et d'une constriction de la marge semblant provenir d'une augmentation de la quantité de calcium à la marge de l'EVL (Holloway et al., 2009). Un phénotype similaire de constriction de la marge est observé lors de l'invalidation de la Synténine (Lambaerts et al., 2012). La protéine $G\alpha_{12/13}$ apparaît aussi comme un régulateur de la polymérisation de l'actine dans le vitellus par un mécanisme faisant intervenir la RhoGTPase RhoA (Lin et al., 2009). Finalement, le facteur de transcription Mtx2 semble également jouer un rôle dans l'établissement de l'anneau d'actine-myosine puisque son invalidation entraîne une diminution significative de la quantité d'actine à la marge de l'EVL ralentissant alors l'épibolie (Wilkins et al., 2008).

Dans un premier temps il a été proposé que la contraction circonférentielle de l'anneau d'actine-myosine est responsable de l'avancement de l'épibolie (Köppen et al., 2006). Cependant, une étude plus récente suggère que cette contraction ne peut à elle seule expliquer

comment l'anneau d'actine conduit l'épibolie notamment avant 50% d'épibolie du fait de la géométrie sphérique de l'embryon (Behrndt et al., 2012). Les auteurs ont donc étudié les mouvements de l'actine et de la myosine au cours de l'épibolie et ils ont découvert l'existence d'un flux rétrograde d'actine-myosine dans le vitellus qui semble également participer à la progression de l'épibolie (Behrndt et al., 2012).

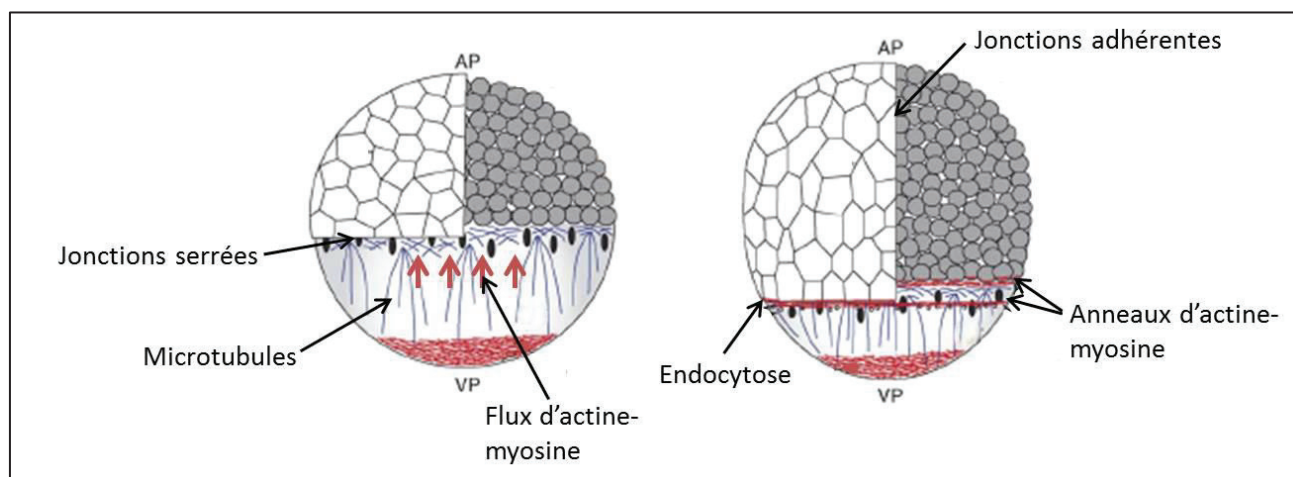


Figure 32 : Mécanismes de l'épibolie

L'épibolie est principalement dirigée par le cytosquelette de microtubules et d'actine du vitellus. Les microtubules exerceraient une traction du YSL qui entraîne les cellules. Des flux rétrogrades d'actine dans le vitellus ainsi que la contraction d'anneaux d'actine-myosine à la marge des blastomères participerait aussi à la migration du blastoderme. L'endocytose de la membrane du vitellus et les jonctions entre les différentes couches cellulaires pourraient également jouer un rôle dans ce processus (d'après Solnica-Krezel, 2006).

3.4.2 Mécanismes des mouvements de convergence et d'extension

Différentes voies de signalisation semblent impliquées dans le contrôle des mouvements de convergence et d'extension. La voie Wnt/PCP est un élément clef de la régulation de ces mouvements, mais d'autres voies pourraient aussi être impliquées comme la voie Stat3, la signalisation BMP, et des éléments de la matrice extracellulaire.

3.4.2.1 La voie de signalisation Wnt/PCP

Les glycoprotéines Wnt appartiennent à une famille de protéines extracellulaires capables de se fixer aux récepteurs transmembranaires Frizzled (Fz) activant ainsi des cascades de signalisation qui régulent les mouvements et la polarité cellulaire. Deux voies de

signalisation Wnt ont été caractérisées : une voie Wnt canonique et une voie Wnt non canonique.

La voie Wnt canonique ou voie Wnt/ β -Caténine est définie par l'activation de la protéine cytoplasmique Disheveled (Dsh), via la fixation des ligands Wnt1 ou Wnt8 au récepteur Fz, qui inhibe le complexe APC-Axin-GSK3 et donc la dégradation de la β -Caténine. Ainsi, la β -Caténine s'accumule et est transloquée au niveau nucléaire où elle va réguler l'expression de gènes cibles (Moon et al., 2004). Cependant, cette voie ne joue qu'un rôle mineur dans les mouvements de convergence et d'extension.

En revanche, la voie Wnt non canonique ou voie Wnt/PCP, en référence à la voie de la polarité planaire cellulaire (PCP) de *Drosophila melanogaster*, est primordiale pour la régulation des mouvements de convergence et d'extension (Heisenberg et al., 2000; Wallingford et al., 2002; Carreira-Barbosa et al., 2003). Cette voie est activée suite à la fixation des ligands Wnt5/Pipetail et Wnt11/Silberbleck aux récepteurs Fz7. L'importance des ligands Wnt5 et Wnt11 dans les mouvements de convergence et d'extension a été démontrée par leur invalidation *in vivo*. En effet, leur déplétion aboutit à des problèmes de convergence et d'extension et à la formation d'un axe antéro-postérieur réduit (Kilian et al., 2003; Ulrich et al., 2005; Zhu et al., 2006). Le récepteur Fz7 activé recrute la protéine Dsh à la membrane cellulaire et stimule ainsi l'activation de petites GTPases (Guanosine Triphosphatases) telles que RhoA, Rac et Cdc42. RhoA et ses effecteurs, Rho Kinase (Rhok) et Diaphanous, régulent alors les cytosquelettes d'actine et de myosine pour favoriser la migration cellulaire (Marlow et al., 2002; Zhu et al., 2006). De manière intéressante, la surexpression de RhoA ou de ses effecteurs Rock et Diaphanous, dans le poisson zèbre est capable de compenser les problèmes de convergence et d'extension des embryons invalidés pour les gènes *wnt5* ou *wnt11*. Ces résultats indiquent un rôle majeur pour RhoA dans l'activité de la voie Wnt/PCP (**Figure 33**) (Marlow et al., 2002; Zhu et al., 2006).

Des expériences de surexpression des ligands Wnt et des récepteurs Fz ont montré une augmentation de la quantité du calcium intracellulaire lors de l'activation de la voie Wnt/PCP au cours du développement embryonnaire (Kühl et al., 2000). Cette augmentation du calcium intracellulaire dépend de l'ouverture de l' IP_3R et entraîne l'activation de la PKC et de la kinase Calcium/Calmodulin-dépendante (CamKII) (Ahumada et al., 2002; Sheldahl et al., 2003; Westfall et al., 2003b). De façon générale, il semble clair que la voie Wnt/ Ca^{2+} peut intervenir sur les mouvements cellulaires lors de la gastrulation, via probablement son interconnexion avec la voie Wnt/PCP. Cependant, des expériences complémentaires doivent

être menées afin d'élucider le rôle exact du calcium intracellulaire sur les mouvements de convergence et d'extension.

3.4.2.2 La voie de signalisation Stat3

La voie de signalisation JAK/Stat3 (Janus Kinase/Signal transducer and activator of transcription) semble également intervenir dans la convergence des cellules du mésoderme (**Figure 33**) (Yamashita et al., 2002; Miyagi et al., 2004). En effet, dans les embryons de poisson zèbre dont le gène *stat3* est invalidé, on observe un retard dans l'initiation de la convergence des cellules du mésoderme latéral (Sepich et al., 2005), ainsi qu'une diminution de la distance de migration de ces cellules (Yamashita et al., 2002).

3.4.2.3 La voie de signalisation des BMP

Chez les vertébrés, pendant la période de la gastrulation, les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) forment un gradient, allant de la région ventrale vers la région dorsale de l'embryon, qui influence la morphologie des cellules dans les différentes couches (Myers et al., 2002a). Ce gradient de BMPs peut aussi intervenir dans les mouvements de convergence et d'extension. En effet, une quantité importante de BMPs dans la région ventrale limite les mouvements de convergence et d'extension en régulant négativement l'expression de *wnt11* et *wnt5a*, deux ligands nécessaires à l'activation de la voie Wnt/PCP (Myers et al., 2002a). De plus, le gradient de BMPs semble également contrôler l'adhésion cellule/cellule pour permettre leur migration vers le pôle dorsal (**Figure 33**) (von der Hardt et al., 2007).

3.4.2.4 La matrice extracellulaire

Les composants de la matrice extracellulaire (ECM : Extracellular Matrix) sont des régulateurs de la migration, de l'adhésion et de la polarité cellulaire au cours du développement des vertébrés. Récemment, une étude a démontré pour la première fois, l'implication de l'organisation des éléments de la matrice extracellulaire dans les mouvements cellulaires existant lors de la période de gastrulation du poisson zèbre (Latimer and Jessen, 2010). En effet, l'invalidation de l'expression de la *fibronectine* aboutit à une altération des mouvements de convergence et d'extension avec des embryons présentant une réduction de la taille de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. De façon intéressante, le phénotype obtenu lors de la délétion de la *fibronectine* est le même que celui obtenu par l'invalidation des intervenants de la voie Wnt/PCP, comme *wnt5/11*, montrant une interconnexion possible avec la voie Wnt/PCP. De plus il a été montré que la voie Wnt/PCP peut activer la matrice-

métalloprotéinase (MMP) 14 et que cette dernière est impliquée dans la migration des cellules lors des mouvements de convergence (Coyle et al., 2008).

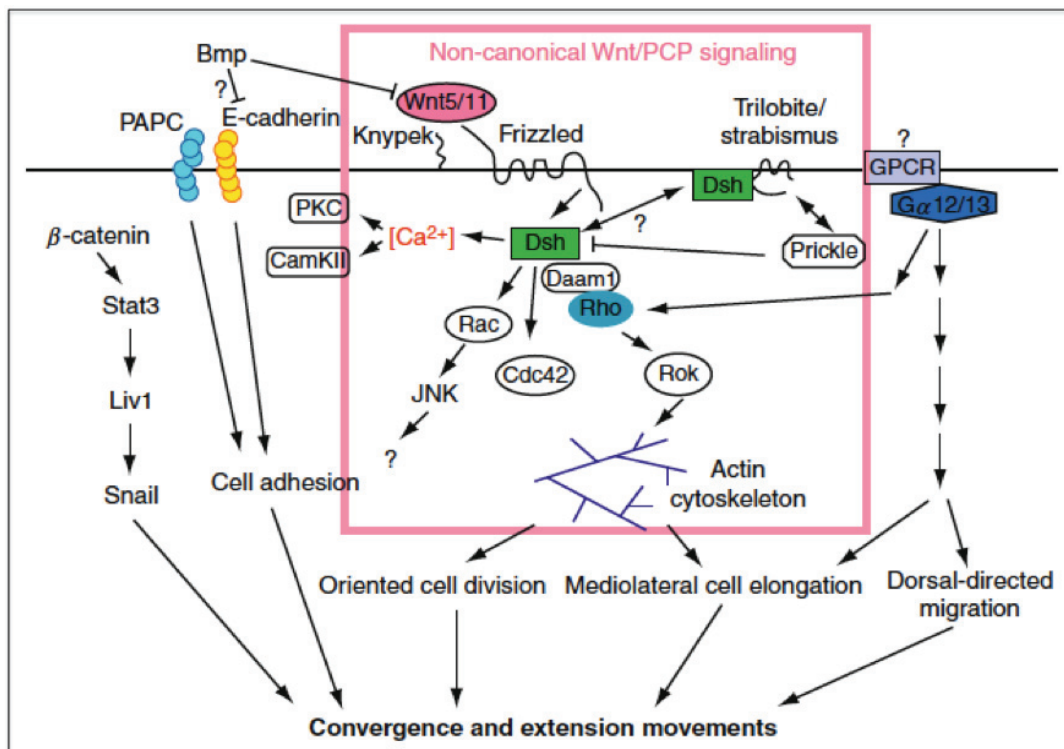


Figure 33 : Régulation moléculaire des mouvements de convergence et d'extension

Suite à une cascade de réactions, la voie Wnt/PCP active des Rho GTPases, telles que RhoA ou Rac, qui contrôlent le cytosquelette d'actine, la division cellulaire orientée ou l'élongation cellulaire médio-latérale et aboutissent à une régulation des mouvements de convergence et d'extension. Les voies BMP et Jak/stat interviennent aussi dans le contrôle de ces mouvements (d'après Yin et al., 2009).

3.5 Implication du calcium au cours du développement du poisson zèbre

La signalisation calcique a été clairement établie comme cruciale pour le bon déroulement du développement embryonnaire du poisson zèbre et elle intervient dans de nombreux processus au cours de l'embryogénèse.

3.5.1 Période de clivage

La signalisation calcique est un élément essentiel de la cytotéière lors des premières divisions cellulaires au cours du développement du poisson zèbre. Lors des premières

divisions cellulaires, une augmentation de la concentration cytosolique de calcium a pu être observée au moment où la cellule se divise et à l'endroit même où le sillon de division apparaît (Chang and Meng, 1995). Dans cette étude les auteurs ont par ailleurs montré que le calcium est relargué par l'IP₃R puisque son inhibition abolit l'augmentation de la concentration de calcium et bloque la division cellulaire, démontrant que le calcium est requis pour la cytodierèse (Chang and Meng, 1995). Au cours de la cytodierèse, il se produit en fait différents signaux calciques correspondant aux différentes étapes de ce processus. Ainsi, au début de la division on observe une élévation de calcium localisée qui précède l'apparition du sillon de division à l'endroit du signal calcique « de positionnement ». S'en suit deux vagues de calcium de part et d'autre du sillon avançant à environ 0,5 µm/s et accompagnant la propagation du sillon le long de la membrane plasmique. Quand les bords du sillon approchent de la marge de la cellule, de nouvelles vagues calciques apparaissent à l'endroit où le sillon s'est formé. Ces vagues se déplacent à 0,5 µm/s le long de la membrane vers la marge de la cellule mais elles se propagent également vers le bas de la cellule à 0,1 µm/s en suivant le creusement du sillon jusqu'à séparation des deux cellules filles (**Figure 34**) (Webb et al., 1997; Chang and Lu, 2000; Lee et al., 2003).

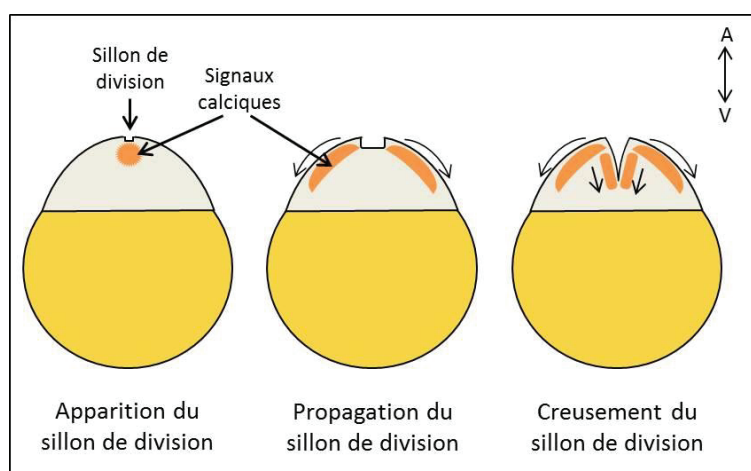


Figure 34 : Signalisation calcique lors de la période de clivage

Lors de la cytodierèse, différents signaux calciques sont générés dans la cellule. Un signal localisé précède l'apparition du sillon de division puis des vagues de calcium apparaissent lors de la propagation et du creusement du sillon.

Il a de plus été montré que le calcium et l'IP₃R sont essentiels aussi bien pour le positionnement du sillon (Lee et al., 2006), que pour sa propagation (Webb et al., 1997) et son creusement (Lee et al., 2003). Le RE, et donc l'IP₃R, se localisent d'ailleurs à proximité de la

membrane plasmique et suivent la progression du sillon lors de la cytodierèse (Lee et al., 2003). Cette localisation de l'IP₃R semble sous la dépendance d'un réseau de microtubules, nommé pf-MTA (pre-furrowing microtubule array), émanant du fuseau mitotique. En effet le pf-MTA se développe jusqu'au lieu où se formera le fuseau mitotique et il s'y co-localise avec l'IP₃R (Lee et al., 2004). Finalement, le calcium relargué au cours de la division de la cellule contrôle différents processus essentiels à la cytodierèse. Ainsi, le calcium semble permettre la contraction d'une bande d'actine-myosine présente sous le sillon et permettant son creusement (Urven et al., 2006; Li et al., 2008). De plus, la division des cellules nécessite la fusion de vésicules avec la membrane plasmique le long du sillon afin d'assurer la formation des deux nouvelles membranes des cellules filles (Feng et al., 2002). Le calcium semble nécessaire au transport de ces vésicules et à leur fusion avec la membrane plasmique (Li et al., 2008).

3.5.2 Période de blastulation

Au moment où la blastula se forme (128 cellules), la signalisation calcique change et l'on commence à voir apparaître des signaux calciques intercellulaires. C'est également durant cette période que l'EVL et la DCL se différencient avec les cellules de la première couche qui s'allongent et s'affinent. Au cours de la blastulation des signaux calciques ne sont observés que dans l'EVL (Reinhard et al., 1995; Ma et al., 2009). Dans la blastula, les signaux calciques sont d'abord générés par des cellules isolées puis comme la blastulation progresse ces signaux deviennent plus fréquents et commencent à former des vagues calciques intercellulaires se propageant entre 2 à 5 cellules adjacentes (**Figure 35**) (Reinhard et al., 1995). De façon intéressante la quasi-totalité des cellules de l'EVL (>90%) génère au moins un pic de calcium au cours la blastulation (Zhang et al., 2011). Ces signaux calciques semblent également provenir de l'IP₃R puisque leur apparition coïncide avec une augmentation de la concentration d'IP₃ dans l'embryon (Reinhard et al., 1995). De plus, l'inhibition de l'IP₃R ou de la voie de synthèse de l'IP₃ réduit très largement l'apparition de pics de calcium dans l'EVL (Westfall et al., 2003a; Ma et al., 2009; Zhang et al., 2011). Ces signaux calciques pourraient d'ailleurs provenir de l'activation de la voie Wnt/Ca²⁺ (Voir partie 3.4.2.1). En effet, la surexpression des ligands Wnt5a ou 8 ou d'un récepteur de Wnt5a, Frizzled-2, augmente le nombre et la fréquence de pics calciques dans l'EVL alors que l'invalidation de Wnt5a réduit le nombre de pics (Slusarski et al., 1997a, 1997b; Westfall et al., 2003b).

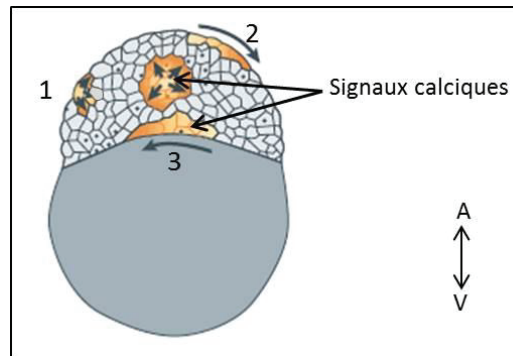


Figure 35 : Signalisation calcique lors de la période de blastulation

Lors de la blastulation des signaux calciques sont générés par les cellules de l'EVL. Ces signaux sont d'abord restreints à une cellule(1) puis ils se propagent aux cellules adjacentes (2). A la fin de la blastulation des pics de calcium apparaissent dans les cellules marginales à l'origine du YSL(3) (d'après Webb et al., 2003).

Cette élévation de la quantité de calcium dans l'EVL pourrait jouer différents rôles mais elle semble tout particulièrement importante pour l'établissement de l'axe dorso-ventral de l'embryon. En effet, l'inhibition de la voie de synthèse de l' IP_3 ou de l' IP_3R pendant la période de blastulation conduit à la formation d'embryons hyper-dorsalisés à 24 hpf (Westfall et al., 2003a). Un phénotype similaire est par ailleurs observé lors de l'invalidation de *Wnt5a* et de façon intéressante ce phénotype est réduit par la surexpression de la CaMKII confirmant l'implication du calcium (Westfall et al., 2003b). Plus récemment, il a été montré que dans des embryons mutants sur le gène *hecate* et présentant des défauts de formation des structures dorso-antérieures la fréquence des pics de calcium dans l'EVL durant la blastulation est largement supérieure à celle observée dans les embryons sauvages (Lyman Gingerich et al., 2005). Finalement, l'observation de la localisation des pics de calcium durant la blastulation semble indiquer que juste après la MBT et ce pendant une heure, la quantité de pics de calcium est plus importante dans la future région dorsale (Ma et al., 2009).

En plus de ce rôle dans l'établissement de l'axe dorso-ventral, il a été proposé que l'augmentation de la quantité de calcium dans les cellules de l'EVL pourrait favoriser leur changement de forme et leur adhésion. En effet, les cellules de l'EVL sont liées par des jonctions serrées et il a été montré que ce type de jonctions est dépendant du calcium intracellulaire (Knust and Bossinger, 2002). Cependant, jusqu'à aujourd'hui le lien entre le calcium et la formation des jonctions n'a pas été établi lors de la blastulation. En revanche, une étude récente suggère que le calcium est important pour le changement de forme des

cellules de l'EVL puisque l'inhibition de l'IP₃R ou de la synthèse d'IP₃ ralentit significativement le changement de forme des cellules de l'EVL (Zhang et al., 2011).

Finalement, les pics de calcium dans l'EVL pourraient aussi jouer un rôle dans la formation du YSL puisqu'entre les stades 512 et 1024 cellules, au moment où le YSL se forme, il semble se produire une élévation du calcium cytosolique dans les cellules de l'EVL en contact avec le vitellus (**Figure 35**) (Webb and Miller, 2000). Cependant, le rôle du calcium dans la formation du YSL n'a jamais été confirmé.

3.5.3 Période de gastrulation

Au cours de la gastrulation l'aspect des signaux calciques change encore passant de signaux localisés à des signaux à plus large échelle. Ainsi, au cours de la gastrulation on voit apparaître des vagues de calcium qui traversent l'embryon bien que certains signaux localisés persistent encore. Ainsi, à partir du stade « germ-ring » un signal calcique localisé apparaît à la marge de la région ventrale de l'embryon. Ce signal persiste jusqu'à environ 65% d'épibolie quand plusieurs autres signaux localisés apparaissent le long de la marge du blastoderme (Gilland et al., 1999). Par la suite des vagues de calcium commencent à apparaître dans l'embryon. Ces vagues se propagent depuis le bouclier embryonnaire soit le long de la marge de la DCL soit vers le pôle antérieur de l'embryon à la vitesse de 5 µm/s à raison d'environ 7 vagues par heure. Ces vagues persistent jusqu'à la fin de la gastrulation (Gilland et al., 1999; Webb and Miller, 2003). Plus récemment, il a été montré qu'entre la fin de la blastulation et le début de la gastrulation il se produit également des vagues calciques dans le YSL (Yuen et al., 2013). Ces vagues apparaissent juste après la formation du dôme et persistent jusqu'à l'apparition du bouclier embryonnaire. Deux types de vagues se forment de façon aléatoire : des vagues rapides (50 µm/s) de courte distance et des vagues lentes (4 µm/s) de longue distance. Ces vagues semblent apparaître plutôt au futur pôle dorsal de l'embryon et dépendent de l'ouverture de l'IP₃R (Yuen et al., 2013). Le rôle de ces différentes vagues de calcium (**Figure 36**) n'est jusqu'à présent pas clairement établi bien que différentes hypothèses aient été formulées.

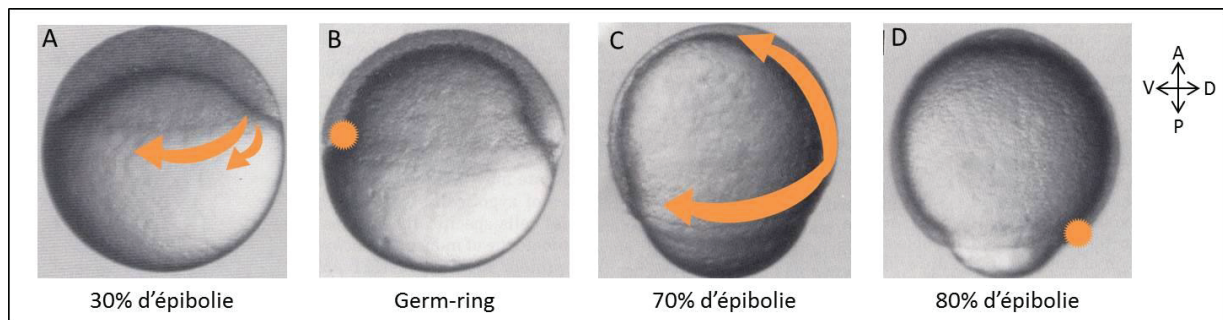


Figure 36 : Signalisation calcique lors de la période de gastrulation

(A) Entre les stades dôme et bouclier des vagues de calcium de courtes et de longues portées apparaissent dans le YSL. (B) Au stade « germ ring » des pics de calcium sont générés dans les blastomères au pôle ventral. (C) A partir de 65% d'épibolie des vagues de calcium sont formées depuis le bouclier embryonnaire et se propagent le long de la marge de la DCL et le long de l'axe dorsal. (D) De plus, des pics de calcium apparaissent dans les DFC entre 60 et 90% d'épibolie.

Ainsi, les vagues de calcium longeant la marge des blastomères pourraient contribuer à la formation ou à la contraction des anneaux d'actine présents à la marge de l'EVL et de la DCL puisque la chélation du calcium perturbe la formation de ces anneaux (Cheng et al., 2004). Ces vagues de calcium pourraient également intervenir dans les mouvements de convergence et notamment agir avec le gradient de BMP qui régule l'adhérence cellule/cellule dépendante du calcium intracellulaire (von der Hardt et al., 2007). Le fait que les vagues calciques se forment toutes au niveau du bouclier suggère également que ces vagues pourraient fournir une « information géographique » aux cellules lors des mouvements d'involution, de convergence et d'extension afin qu'elles puissent se localiser dans l'embryon et ainsi répondre de façon adéquate à des signaux plus locaux (Webb and Miller, 2006). De plus, l'apparition des vagues de calcium le long de l'axe antéro-postérieur correspond temporellement et spatialement à l'induction neurale, un processus permettant la spécialisation de l'ectoderme en neuro-ectoderme. Dans d'autres espèces comme le xénope il a été montré que pendant la gastrulation, des vagues de calcium se propagent le long de l'ectoderme dorsal et participent à l'induction neurale (Leclerc et al., 2000) suggérant qu'un mécanisme similaire pourrait exister chez le poisson zèbre (Webb et al., 2005). Enfin, du fait de leur localisation préférentielle au pôle dorsal, les vagues de calcium se propageant dans le YSL au début de la gastrulation pourraient participer à la spécification du bouclier comme centre organisateur. En effet, il a été suggéré que le côté dorsal du vitellus joue le rôle de centre de Nieuwkoop, qui induit la formation de l'organisateur de Spemann-Mangold chez le

xénope. En effet, certains gènes capables d'induire l'organisateur sont exprimés spécifiquement du côté dorsal du YSL (Koos and Ho, 1998; Yamanaka et al., 1998) et leur expression pourrait donc être induite par ces vagues de calcium.

Finalement, il semble que la signalisation calcique lors de la gastrulation puisse également réguler la symétrie droite/gauche de l'embryon. La plupart des vertébrés possèdent une symétrie bilatérale interne avec le cœur, les poumons, le foie et l'intestin précisément positionnés le long de l'axe gauche-droite. L'établissement de cet axe gauche/droite chez les embryons de poisson zèbre est contrôlé par une structure ciliée, nommée la vésicule de Kupffer (Essner et al., 2005). Cette vésicule est formée au début de la segmentation au niveau de la région du bourgeon caudal « tailbud » par des cellules progénitrices de la région dorsale (mesodermal Dorsal Forerunner Cells : DFC). Il a été montré qu'entre 60 et 90% d'épibolie des pics de calcium apparaissent dans les DFC (**Figure 36**) (Schneider et al., 2008). Un traitement bref des embryons à 60% d'épibolie avec de la thapsigargine, un inhibiteur de SERCA, aboutit à la formation d'embryons avec des axes antéro-postérieurs et dorso-ventral normaux mais avec une vésicule de Kupffer réduite et une symétrie droite/gauche altérée (Kreiling et al., 2008; Schneider et al., 2008). Ainsi le traitement à la thapsigargine doit inhiber la formation des pics de calcium dans les DFC et les auteurs ont montré que cela affecte l'expression de plusieurs gènes essentiels à la symétrie comme *lefty 1/2* (Kreiling et al., 2008; Schneider et al., 2008).

3.5.4 Période de segmentation

Après la mise en place des différents feuilletts et l'acquisition de l'architecture globale de l'embryon au cours de la gastrulation, les signaux calciques deviennent à nouveau plus localisés au cours de la période de segmentation. Ainsi des signaux calciques sont principalement observés au niveau du tronc où se forment les somites, dans la partie antérieure de l'embryon siège du futur cerveau et dans la partie postérieure où va émerger la queue.

Concernant le tronc de l'embryon différents signaux calciques ont été décrits. Dans un premier temps il a été montré que des vagues de calcium lentes ($0,07 \mu\text{m/s}$) se propagent de la région antérieure vers la région postérieure entre 10 et 14 hpf (**Figure 37**) (Créton et al., 1998). Cette période correspond à la formation des 10 premières paires de somites suggérant que ces vagues de calcium pourraient participer à l'établissement de ces structures. D'autres vagues calciques très localisées semblent également se produire dans des groupes de cellules mésodermes pré-somitiques juste avant la formation des somites (**Figure 37**). Ces vagues se

propagent le long des cellules sur une longueur correspondant à peu près à la taille d'un somite suggérant que ce signal calcique pourrait participer à la détermination de la frontière des somites (Brennan et al., 2002). En plus des vagues de calcium, des pics de calcium apparaissent également au cours de la somitogénèse. Dans une première étude des pics apparaissant de façon aléatoire pour une durée variable de 10 à 140 s (moyenne de 40 s) ont été décrits. Ils semblent principalement se former à la frontière médiane ou latérale des somites déjà formés (**Figure 37**) (Leung et al., 2009). Bien qu'aléatoires, ces pics de calcium pourraient jouer un rôle dans la constitution des somites. En effet, ces auteurs ont pu inhiber l'apparition des pics de calcium dans les somites avec un inhibiteur de l'IP₃R ou avec l'application localisée d'un chélateur de calcium et ils ont ainsi observé un allongement des somites dans l'axe médio-latéral (Leung et al., 2009). Dans une deuxième étude deux autres types de pics de calcium ont été décrits (**Figure 37**) (Freisinger et al., 2010). Les premiers apparaissent dans le mésoderme présomitique avant la formation des somites et persistent quelques temps entre les somites une fois ceux-ci formés. Les auteurs ont également observé l'apparition de pics plus courts (~30 s) dans les somites avec une fréquence d'environ 5 pics par heure. Ces derniers semblent par ailleurs contrôlés par la voie Wnt/Ca²⁺ puisque l'inactivation de Wnt5a diminue la fréquence des pics de calcium. Inversement, l'inactivation de RGS3, un régulateur négatif des protéines G, augmente considérablement la fréquence des pics suggérant un rôle pour cette protéine dans la régulation négative de la voie Wnt/Ca²⁺ (Freisinger et al., 2010). De façon intéressante, l'inactivation de Wnt5a ou de RGS3 provoque des défauts de formation des somites suggérant que ces deux protéines sont importantes dans la somitogénèse via le contrôle des flux calciques.

En plus de la somitogénèse, il a récemment été montré que le calcium pourrait également intervenir dans l'ébauche du pronéphros puisque l'inhibition de l'IP₃R pendant la période de segmentation perturbe ce phénomène (Lam et al., 2009).

Dans la région antérieure de l'embryon on observe une élévation de la concentration de calcium au début de la période de segmentation dans la région présomptive du mésencéphale et du prosencéphale. Cette élévation devient plus prononcée à 12 hpf et persiste jusqu'à 16 hpf. Dans la région présomptive du rhombencéphale la concentration calcique est toujours plus faible que dans le reste de la région antérieure bien qu'une légère augmentation soit visible à 14 hpf, ce qui correspond à la formation de la placode otique (Créton et al., 1998). Dans leur ensemble ces observations suggèrent un rôle du calcium dans le développement du cerveau mais jusqu'à présent il n'existe pas d'étude établissant clairement ce lien dans le poisson zèbre.

Dans la région la plus postérieure de l'embryon où va se développer la queue, la concentration de calcium augmente progressivement au cours de la segmentation et devient importante à 16 hpf quand la queue commence à s'agrandir (**Figure 37**) suggérant également une implication du calcium dans la formation de la queue (Créton et al., 1998). Cependant comme pour le cerveau il n'existe pas de preuve directe du lien entre le calcium et l'allongement de la queue.

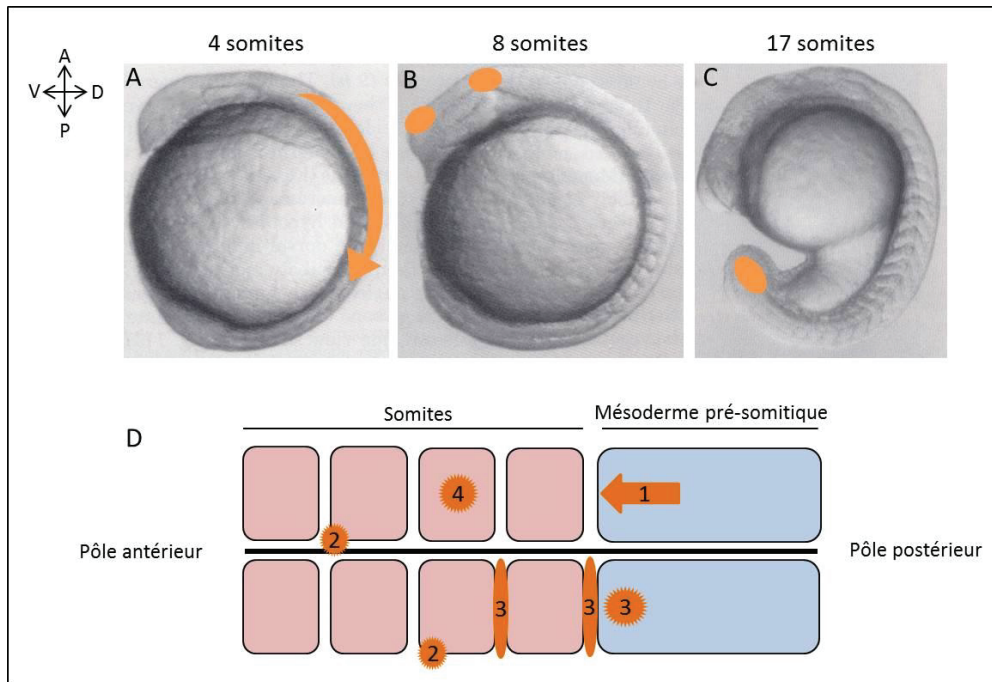


Figure 37 : Signalisation calcique lors de la période de gastrulation

(A) Au début de la segmentation des vagues lentes de calcium se propagent vers le pôle postérieur de l'embryon le long de l'axe dorsal. (B) Entre 12 et 16 hpf, des pics de calcium apparaissent dans la région antérieure de l'embryon. (C) A partir de 16 hpf, lorsque la queue s'allonge des signaux calciques sont générés dans la région postérieure de l'embryon. (D) Au cours de la somitogénèse des vagues de calcium apparaissent dans le mésoderme pré-somitique (1). De plus, des pics de calcium aléatoires sont générés à la frontière des somites (2). Une élévation de calcium dans le mésoderme pré-somitique et persistant entre les somites néo-formés (3) est également observée. Des pics de calcium sont aussi générés dans les somites déjà formés (4).

3.6 La machinerie apoptotique au cours du développement du poisson zèbre

Les premiers travaux portant sur l'étude de l'apoptose dans l'embryon de poisson zèbre ont rapporté que le traitement des embryons avec du nocodazole (agent dépolymérisant des microtubules) n'induit l'apoptose que durant la gastrulation alors qu'il induit simplement un arrêt du cycle cellulaire plus précocement. De plus l'apoptose est observé dans l'EVL et la DCL mais pas dans le YSL (Ikegami et al., 1997). Le même groupe a ensuite observé une cinétique similaire de déclenchement de l'apoptose lors d'un traitement à la camptothécine (agent inhibiteur de la Topoisomérase I) (Ikegami et al., 1999). Les auteurs ont ainsi proposé que lors de la blastulation l'embryon se tournerait plutôt vers un arrêt de la prolifération des cellules endommagées que vers leur apoptose. Ceci semble cohérent avec une étude portant sur les gènes exprimés à la MBT montrant que *apaf-1*, essentiel à la formation de l'apoptosome, est un gène zygotique (O'Boyle et al., 2007). Cependant ces résultats sont remis en question par une étude récente montrant que la surexpression des orthologues chez le poisson zèbre de Bim et dans une moindre mesure de Puma entraîne l'activation de la caspase-3 dès le stade 4-cellules (Jette et al., 2008). Comme *apaf-1* est un gène zygotique, ceci suggère que soit la protéine Apaf-1 est transmise maternellement soit qu'il existe avant la MBT une voie alternative menant à l'activation des caspases. Une autre étude a montré que la quasi-totalité des protéines de la famille Bcl-2 (à l'exception de Bak, Bcl-w, Bfl-1 et Hrk) étaient conservées chez le poisson zèbre. Du fait de la duplication du génome observée chez les poissons téléostéens, plusieurs gènes sont dupliqués chez le poisson zèbre, dont *mcl-1*, *bmf*, *bok* et *bax* (Kratz et al., 2006). Les auteurs ont également montré que la surexpression des orthologues des membres anti-apoptotiques protège l'embryon de l'apoptose alors que celle des orthologues des pro-apoptotiques a l'effet inverse. De plus l'invalidation des membres anti-apoptotiques sensibilise les embryons à la mort cellulaire. Il apparaît donc que dans l'embryon de poisson zèbre la machinerie apoptotique est conservée et que les protéines de la famille Bcl-2 sont bien capables de réguler l'apoptose.

Au sein de notre groupe nous nous intéressons tout particulièrement au membre anti-apoptotique Nrz, l'orthologue de Nr-13/Bcl2l10 chez le poisson zèbre caractérisé par Arnaud et collaborateurs (Arnaud et al., 2006). *Nrz* est un gène zygotique qui est exprimé uniquement dans le YSL lors de la gastrulation et plus tard dans les somites et le télencéphale lors de la période de segmentation. De façon intéressante, l'invalidation de Nrz se traduit par un arrêt de l'épibolie suivi d'une constriction de la marge des blastomères. Ceci aboutit au détachement

du blastoderme et du vitellus entraînant la mort de l'embryon, ce processus étant indépendant de l'activation des caspases (Arnaud et al., 2006). Les embryons qui survivent présentent un défaut de formation de la queue et de la tête dû à une apoptose accrue dans ces régions de l'embryon. Ainsi, Nr2 semble exercer un rôle distinct de celui de régulateur de l'apoptose lors de la gastrulation. Cette protéine est donc un excellent candidat pour l'étude des fonctions non-apoptotiques des protéines de la famille Bcl-2 dans le développement embryonnaire.

INTRODUCTION AU SUJET DE RECHERCHE

Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'implication des protéines de la famille Bcl-2 dans le développement embryonnaire du poisson zèbre. Comme décrit précédemment ces protéines sont les principaux régulateurs de la mort cellulaire programmée apoptotique et l'équilibre entre membres pro- et anti-apoptotiques déterminent le sort de la cellule. De plus, il apparaît que ces protéines sont également capables de contrôler d'autres processus tels que le cycle cellulaire ou encore le métabolisme énergétique. Les mécanismes d'action des protéines de la famille Bcl-2 dans ces processus non-apoptotiques ne sont cependant pas clairement établis. Au sein de notre équipe nous nous intéressons justement aux rôles non-apoptotiques que ces protéines peuvent jouer au cours du développement embryonnaire. Ainsi, mes travaux de thèse ont consisté à élucider les mécanismes d'actions de deux membres de la famille Bcl-2 durant l'embryogénèse du poisson zèbre.

La première partie de mon travail a porté sur l'étude de l'orthologue de *nr-13* chez le poisson zèbre, *nrz*. Le gène *nr-13* a été identifié dans le laboratoire de Gilbert Brun lors du criblage d'une banque d'ADNc obtenue à partir de cellules de neurorétines de caille infectées par le virus du Sarcome de Rous (RSV) (Gillet et al., 1993). Dans l'un des clones isolés (clone 13), Gillet et collaborateurs ont identifié un nouveau gène homologue de *bcl-2* et activé par v-Src, un oncogène codé par le RSV (Gillet et al., 1995). Ce gène, nommé *nr-13* (neuroretina clone 13) code pour une protéine anti-apoptotique contenant 4 domaines d'homologie BH et un domaine transmembranaire C-terminal. Pendant, le développement embryonnaire du poulet, Nr-13 est exprimée dans le cœur, les muscles, le tectum optique et la bourse de Fabricius. De façon intéressante l'invalidation de *nr-13* conduit à une apoptose massive dans la bourse de Fabricius confirmant la fonction anti-apoptotique de la protéine Nr-13 (Lee et al., 1999b). Par la suite, les orthologues humain (Nrhl/Bcl2l10) (Aouacheria et al., 2001), murin (Diva/Boo) (Inohara et al., 1998; Song et al., 1999) et du poisson zèbre (Nrz) (Arnaud et al., 2006) ont été caractérisés. Les travaux initiaux conduits par Arnaud et collaborateurs ont montré que *nrz* est exprimé au cours du développement précoce du poisson zèbre. Nrz est spécifiquement exprimée dans la couche syncytiale vitelline (YSL) pendant la gastrulation puis au cours de la segmentation son expression devient majoritaire dans les somites et le télencéphale. L'invalidation de *nrz* par un morpholino spécifique s'accompagne d'ailleurs d'une apoptose massive dans ces deux dernières structures. Cependant, une mortalité précoce des embryons est également observée pendant la gastrulation. Ce dernier phénotype est indépendant de l'activation des caspases et se caractérise par un arrêt de

l'épibolie suivi d'une constriction de la marge des blastomères aboutissant au détachement du blastoderme et du vitellus (**Figure 38**).

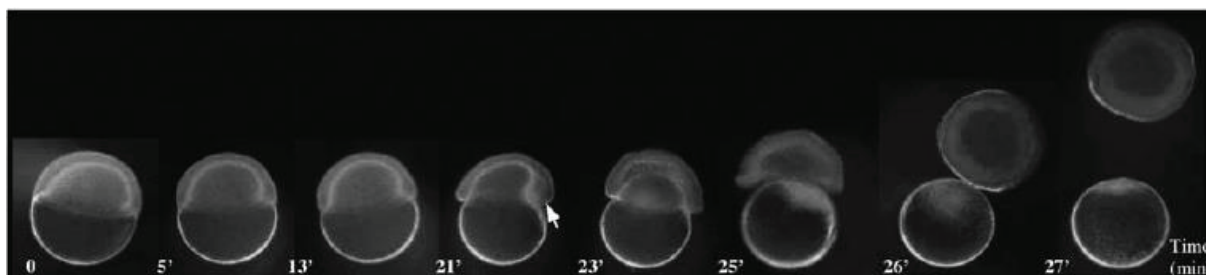


Figure 38 : Phénotype précoce induit par l'invalidation de *nrz*

Pendant l'épibolie, on observe une constriction de la marge des blastomères (indiquée par une flèche) aboutissant au détachement du blastoderme et du vitellus (d'après Arnaud et al., 2006).

Dans cette étude, les auteurs ont observé une augmentation de l'expression de *snail1* à la marge des embryons invalidés pour *nrz*. Snail-1 est un facteur de transcription inhibant l'adhésion cellulaire par répression de protéines telles que la E-Cadhérine. Ces résultats suggèrent qu'une modification de l'adhésion cellule/cellule pourrait être responsable du phénotype observé. Cependant, le mécanisme par lequel Nrz pourrait réprimer l'expression de Snail n'a pas été décrit. De plus, la perte d'interaction n'explique pas la constriction de la marge observée lors de l'invalidation de *nrz*. Ainsi, une majeure partie de mon projet de thèse a consisté à caractériser le mécanisme d'action de Nrz lors de la gastrulation afin de comprendre de quelle façon cette protéine peut réguler les mouvements d'épibolie.

Dans une deuxième partie de ma thèse, j'ai participé à la caractérisation d'une nouvelle protéine de la famille Bcl-2, Bcl-wav (pour Bcl-2 homolog found in water-living anamniotes vertebrates). Cette protéine a été découverte par homologie de structure avec la partie centrale des protéines Bcl-2 (hélices $\alpha 5$ et 6). Cette méthode permet l'identification d'homologues distants possédant une forte divergence de structure primaire comme Bcl-wav qui ne possède que 17% d'homologie avec Bcl-2. Le gène *bclwav* est retrouvé uniquement chez les poissons osseux et les anoues et bien que des ESTs (Expression Sequence Tag) étaient déjà décrites notamment chez le saumon ou le xénope, la fonction de Bcl-wav restait à déterminer. Ainsi, au cours de ma thèse j'ai aidé à caractériser la fonction et le mécanisme d'action de Bcl-wav au cours du développement précoce du poisson zèbre.

RÉSULTATS

Article n°1

The apoptotic regulator Nrz controls cytoskeletal dynamics via regulation of Ca²⁺ trafficking in zebrafish blastula

Popgeorgiev N, Bonneau B, Ferri KF, Prudent J, Thibaut J, Gillet G

Developmental Cell, 2011 May 17;20(5):663-76.

1 RÉSUMÉ ARTICLE N°1

Dans cette première étude nous nous sommes attachés à caractériser le phénotype induit par l'invalidation de *nrz* lors de la gastrulation. Le gène *nrz* est exprimé spécifiquement au niveau de la couche syncytiale vitelline (YSL) aux stades précoces du développement. Ici nous avons montré que dans cette région particulière de l'embryon on trouve un réseau dense de mitochondries et de membranes du RE où Nrz se localise grâce à son domaine hydrophobe C-terminal. Comme décrit précédemment l'invalidation de *nrz* induit un phénotype précoce léthal, caractérisé par une constriction précoce de la marge, le détachement des blastomères du sac vitellin et la mort de l'embryon.

Dans cette étude nous avons également observé lors de l'invalidation de *nrz* une perte du potentiel transmembranaire des mitochondries du YSL ainsi qu'un relargage de cytochrome c depuis ces mitochondries. Ces altérations mitochondriales sont caractéristiques de l'apoptose. Cependant, nos résultats suggèrent fortement que ce phénotype est indépendant des caspases car ni l'inhibiteur pan-caspases, z-VAD, ni la surexpression d'un inhibiteur spécifique de la caspase 3, p35, ne sont capables d'inhiber ce phénotype. De plus, un mutant de Nrz adressé spécifiquement à la mitochondrie (NrzMaoB) est capable de prévenir les dysfonctionnements mitochondriaux sans pour autant empêcher la mort de l'embryon suggérant que ces altérations ne sont pas la cause du phénotype induit par l'invalidation de *nrz*. Cependant, un mutant de Nrz adressé au RE (NrzCytB5) inhibe également le relargage du cytochrome c et la chute du potentiel transmembranaire de la mitochondrie mais surtout bloque la constriction précoce de la marge et la mort de l'embryon. Ces résultats suggèrent que les altérations mitochondriales sont une conséquence d'un signal en amont provenant du réticulum endoplasmique et que la localisation de Nrz dans ce compartiment est indispensable pour sa fonction au cours du développement précoce du poisson zèbre.

De façon intéressante, nous avons pu montrer que l'invalidation de *nrz* entraîne une augmentation massive de la concentration de calcium intracellulaire principalement au niveau de la marge des blastomères. Seul le mutant NrzCytB5 est capable de prévenir ce phénomène suggérant que Nrz est capable de réguler la sortie de calcium depuis le RE. Par des expériences de co-immunoprécipitation nous avons montré que Nrz est capable de se lier à l'IP₃R1. Cette interaction dépend du domaine BH4 de Nrz et diminue la quantité de calcium libéré par le canal. Ainsi le mutant ΔBH4NrzCytB5 tronqué de son domaine BH4 se révèle incapable d'inhiber l'augmentation du calcium intracellulaire et la constriction de la marge

induites par l'invalidation de *nrz* suggérant que l'interaction de Nrz avec l'IP₃R est cruciale pour la régulation des flux calciques dans le YSL.

Au cours du développement embryonnaire normal, un anneau d'actine-myosine se forme à la marge des blastomères de façon dépendante du calcium et de la phosphorylation de MLC2 (Cheng et al., 2004; Köppen et al., 2006). Dans les embryons invalidés pour *nrz*, cet anneau apparaît précocement et de façon remarquable, nos résultats montrent que MLC2 est hyperphosphorylée dans ces embryons. Par une approche pharmacologique, nous avons montré que la kinase MLCK était responsable de cette phosphorylation. Par ailleurs, le traitement des embryons *nrz*MO avec un antagoniste de la Calmoduline (W13) inhibe la constriction précoce de la marge, suggérant que l'activation de MLCK par la Calmoduline est responsable de la formation précoce de l'anneau. Ainsi, l'invalidation de *nrz* en induisant une augmentation de la concentration de calcium cytosolique provoquerait la formation précoce de l'anneau d'actine-myosine qui en se contractant aboutirait à détacher les blastomères du vitellus.

En conclusion, nos résultats ont permis d'établir que Nrz joue un rôle primordial dans l'épibolie *via* le contrôle de la signalisation calcique et de la dynamique du cytosquelette au cours du développement embryonnaire précoce du poisson zèbre.

The Apoptotic Regulator Nrz Controls Cytoskeletal Dynamics via the Regulation of Ca^{2+} Trafficking in the Zebrafish Blastula

Nikolay Popgeorgiev,^{1,2} Benjamin Bonneau,^{1,2} Karine F. Ferri,² Julien Prudent,^{1,2} Julien Thibaut,² and Germain Gillet^{1,2,*}

¹CRCL U1052 INSERM, UMS 3443 CNRS, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France

²IBCP UMR 5086 CNRS-Université Lyon I, IFR 128, 7, passage du Vercors, 69367 Lyon 07, France

*Correspondence: gillet@lyon.fnclcc.fr

DOI 10.1016/j.devcel.2011.03.016

SUMMARY

Bcl-2 family members are key regulators of apoptosis. Their involvement in other cellular processes has been so far overlooked. We have studied the role of the Bcl-2 homolog Nrz in the developing zebrafish. Nrz was found to be localized to the yolk syncytial layer, a region containing numerous mitochondria and ER membranes. Nrz knockdown resulted in developmental arrest before gastrulation, due to free Ca^{2+} increase in the yolk cell, activating myosin light chain kinase, which led to premature contraction of actin-myosin cables in the margin and separation of the blastomeres from the yolk cell. In the yolk syncytial layer, Nrz appears to prevent the release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum by directly interacting with the IP3R1 Ca^{2+} channel. Thus, the Bcl-2 family may participate in early development, not only by controlling apoptosis but also by acting on cytoskeletal dynamics and cell movements via Ca^{2+} fluxes inside the embryo.

INTRODUCTION

The Bcl-2 family plays a central role in apoptosis; it controls the release of cytochrome c from the mitochondria into the cytosol, which triggers the formation of the apoptosome complex and caspase activation, leading to cell death. Cytochrome c release is due to the insertion of the apoptosis accelerator Bax into the outer mitochondrial membrane, which is blocked by Bcl-2 and related apoptosis inhibitors (for review, see Wang and Youle, 2009). In addition to the mitochondria, apoptosis inhibitors are also found in the endoplasmic reticulum (ER) where they participate in the regulation of Ca^{2+} fluxes (for review, see Rong and Distelhorst, 2008). Indeed, Bcl-2 modulates the release of Ca^{2+} from the ER by directly inactivating Bax and/or by interacting with the Ca^{2+} channel IP3R (Chen et al., 2004; Rong et al., 2009).

In addition to IP3R, Bcl-2 family members interact with a variety of partners, including G proteins (Bivona et al., 2006), phosphatases (Shibasaki et al., 1997), kinases (Wang et al., 1994; Youn et al., 2005), transcription factors (de Moissac et al., 1998), and chaperone proteins (Takayama et al., 1995; Shirane

and Nakayama, 2003). This illustrates that Bcl-2 proteins play multiple roles inside the cell and can control the cell cycle (Zinkel et al., 2006), cell differentiation (Wang et al., 2007), axonal elongation (Jiao et al., 2005), redox status (Kowaltowski and Fiskum, 2005), and metabolism (Chen and Pervaiz, 2010). However, the underlying molecular mechanisms remain largely unknown.

The role of Bcl-2 like proteins during development was established by the work of R. Horwitz and M. Hengartner in *C. elegans* (Hengartner and Horvitz, 1994). Investigations in *Drosophila* and vertebrate models confirmed the role of the apoptosis machinery in development and morphogenesis (for review, see Chipuk et al., 2010).

The zebrafish is a unique model for studying the mechanisms of development in vertebrates (Shestopalov and Chen, 2010) and of a number of human pathologies, including cardiovascular diseases and cancer (Lam et al., 2006; Lieschke and Currie, 2007). During early development, after rapid cellular divisions, the blastomeres in contact with the yolk release their content in the yolk cell forming the yolk syncytial layer (YSL). At this stage the embryo comprises the YSL, the enveloping layer (EVL), and the deep cell layer (DCL). Prior to gastrulation, the blastomeres begin to migrate from the animal pole down to the vegetal pole. This process, known as epiboly, is driven by multiple mechanisms, including yolk cytoskeleton remodeling and endocytosis. Completion of epiboly is characterized by the formation of an actin-myosin ring close to vegetal pole of EVL and DCL (Solnica-Krezel, 2006).

We recently demonstrated that the knockdown of the apoptosis inhibitor *nrz* (the zebrafish ortholog of human *nrh/bcl-2l10*) leads to premature death of the embryo due to developmental arrest before the onset of gastrulation. This phenotype could be partly prevented by the downregulation of the Snail pathway, but not by caspase inhibition, suggesting that the effect of *nrz* knockdown might not be due to apoptosis deregulation (Arnaud et al., 2006).

Here, we show that *nrz* knockdown results in Ca^{2+} -dependent phosphorylation of the myosin light chain (MLC). We show that the knockdown of *nrz* increases free Ca^{2+} levels in the region of the margin (between the embryonic blastomeres and the yolk cell). We present evidence that the Ca^{2+} -dependent kinase MLCK is required for the observed MLC phosphorylation and subsequent epiboly arrest. Together, our results support the notion that the Nrz protein plays a key role during epiboly by controlling the formation of actin-myosin cables and cell movements via the regulation of Ca^{2+} fluxes from the ER. Thus, in

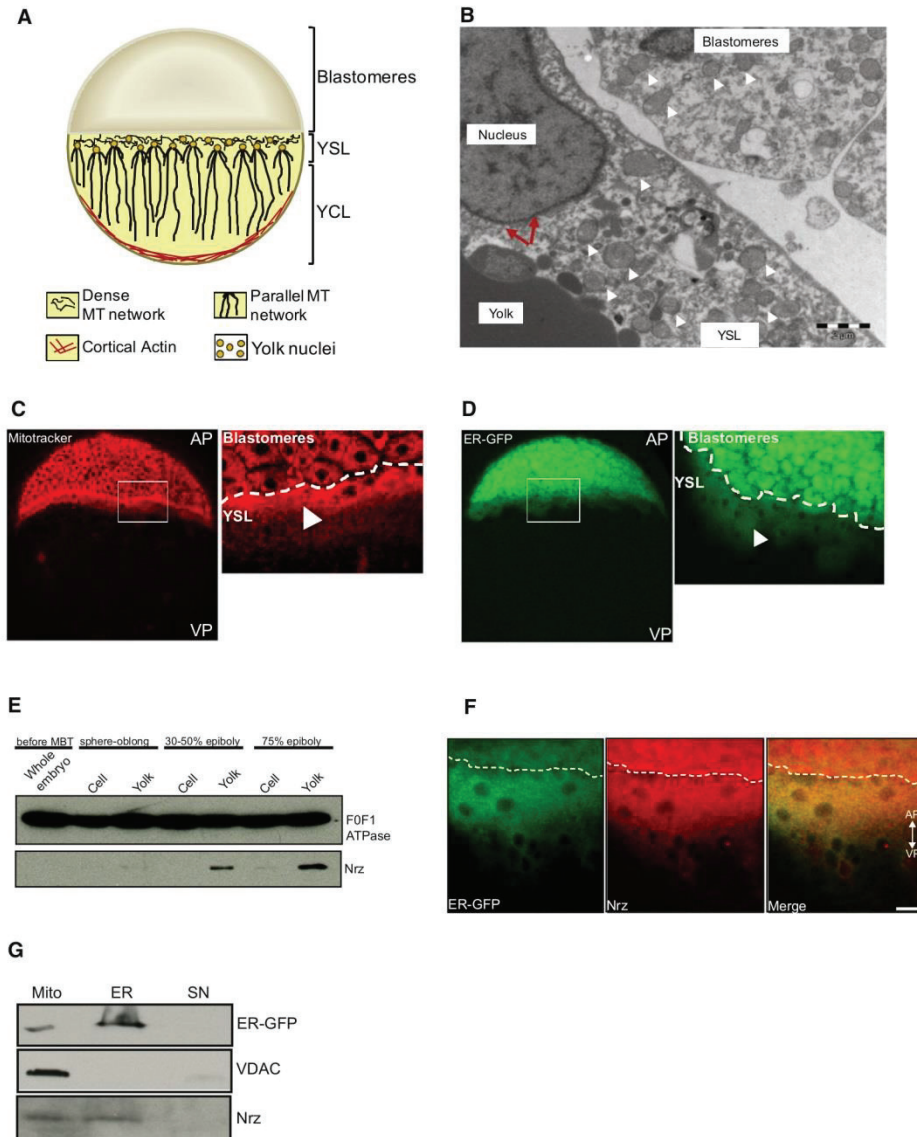


Figure 1. Nrz Protein Is Located into YSL Mitochondria and ER

(A) Schematic drawing of a zebrafish embryo representing a simplified model of yolk organization. YSL contains a large number of nuclei present beneath the blastoderm. The region populated with yolk nuclei presents a dense network of microtubules from which originates a parallel microtubule network oriented along the animal-vegetal axis and extending into the yolk cell layer. MT, microtubules; YSL, yolk syncytial layer; YCL, yolk cell layer.

(B) Transmission electron microscopy image of the interface region between the YSL and the deep cells showing the presence of numerous mitochondria inside the blastomeres and the YSL (white arrowheads). Membranes reminiscent from ER are visible in the vicinity of a YSL nucleus (red arrows). Scale bar: 2 μ m.

(C) Confocal section of zebrafish embryo stained in vivo with Mitotracker Red in the margin region showing the presence of a belt of mitochondria in the YSL (arrowhead).

(D) Confocal section of zebrafish embryo expressing recombinant EGFP targeted into the ER membrane (ER-GFP); a fluorescent signal can be detected in the YSL (arrowhead). White rectangles materialize regions observed at higher magnification (right panels). AP, animal pole; VP, vegetal pole.

(E) Immunoblot of whole embryo (before MBT stage) or blastomere and yolk mitochondrial extracts (sphere-oblong, 30%–50%, or 75% epiboly stages) showing the presence of Nrz protein in the yolk mitochondrial fraction. F0/F1 ATPase is used for calibration.

(F) Confocal microscopy analysis. Detection of ER-GFP (green, left) and endogenous Nrz protein (red, middle) at the margin (50% epiboly). Merged images show colocalization of ER-GFP and Nrz (yellow, right). Dashed line separates blastomeres from YSL. Scale bar: 20 μ m. Specificity of the anti-Nrz antibody was assessed using Nrz-depleted embryos as negative control (see Figure S1).

addition to controlling apoptosis, the Bcl-2 family may participate in the development of vertebrates by acting on cytoskeletal dynamics and cell movements.

RESULTS

Zebrafish YSL Harbors Active Mitochondria and ER Network

We previously showed that the *nrz* gene, a member of the *bcl-2* family of cell death regulators, is specifically expressed at the onset of epiboly in the extramembranous YSL of the zebrafish embryo (Arnaud et al., 2006). This belt-like layer contains a number of nuclei as well as microtubules, which participate in epiboly progression (Figure 1A) (Solnica-Krezel, 2006). In addition, the YSL is expected to contain a variety of components such as ER or Golgi apparatus, originating from the blastomeres having fused with the yolk cell. So far, the presence of mitochondria in the yolk cell of the developing zebrafish has not been reported. As shown in Figure 1B, transmission electronic microscopy analysis showed the presence of a number of mitochondria in the YSL. Protrusive structures originating from the nuclear envelope strongly suggested the existence of ER in this region. To further assess the presence of mitochondria and ER in the YSL, embryos were stained in vivo with the mitochondrial probe Mitotracker or injected with in vitro synthesized mRNAs encoding an EGFP mutant containing the transmembrane (TM) domain of the tail-anchored ER protein Cytochrome B5 (ER-GFP). Confocal microscopy analyses confirmed the presence of numerous mitochondria forming a ring like structure and of a dense ER network inside the YSL (Figures 1C, 1D, and S1A). Of note, the fact that YSL mitochondria could be labeled with Mitotracker, which is driven into the matrix by the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), suggested that these organelles are actually functional.

In cultured cells, the Nrz protein is located in mitochondria and the ER (Figure S2A), which suggested that Nrz might also interact with these organelles in the YSL. Indeed, as shown in Figures 1E and S1B, the Nrz protein is detected in the YSL as early as the sphere-oblong stage both in mitochondria and ER fractions, remaining undetectable in the blastomeres. Confocal microscopy analyses and fractionation experiments confirmed the dual localization of Nrz in the YSL ER and mitochondria during epiboly progression (Figures 1F, 1G, S1B, and S1C).

Functional Interaction of Nrz with Mitochondria and ER Membranes into the YSL

Knockdown of *nrz* with specific morpholinos results in early developmental arrest (Arnaud et al., 2006); in *nrz* morphants, progression of the blastomeres down to the vegetal pole starts normally; however, this movement is stopped short before the margin reaches the equator of the yolk cell (40%–60% epiboly); premature constriction of the margin occurs at the same time, leading to separation of the blastomeres from the yolk and death

of the embryo (Movie S1). Constriction of the margin was quantified by measuring the embryo length/width ratio (LWR) at 50% epiboly-shield stages. The LWR of control embryos is close to 1 ($LWR = 1.001 \pm 0.02$, $n = 34$) whereas in *nrz* morphants it is significantly higher ($LWR = 1.36 \pm 0.06$, $n = 34$) (Figures 2A and 2B).

The Bcl-2 family of proteins participates in the regulation of apoptosis and other cellular processes via interaction of their TM domain with mitochondrial and ER membranes (Rizzuto et al., 2009). Nrz contains a C-terminal TM domain, as do most Bcl-2 family members. In zebrafish, the “early epiboly arrest” phenotype of *nrz* morphants could be rescued by coinjecting, together with the *nrz* antisense morpholino, in vitro synthesized mRNAs encoding full-length Nrz (mortality at 10 hpf: $7.2\% \pm 4.8\%$; $n = 158$) but not the Δ TM truncated protein devoid of its C-terminal membrane insertion domain (mortality at 10 hpf: $49.8\% \pm 18.8\%$; $n = 106$) (Figures 2C and 2D). This suggested that the interaction of Nrz with biological membranes was required for epiboly. To study the role of the membrane-associated pools of Nrz in more detail, two recombinant Nrz proteins were designed by replacing the native C-terminal TM domain by either the CytB5 ER-addressing TM domain (NrzCytB5) or the MaoB mitochondrial-addressing domain (NrzMaoB). The subcellular localization of both recombinant proteins as well as their ability to prevent zBax-induced cell death was checked in cultured cells before expressing in zebrafish embryo (Figures S2B–S2F). Surprisingly, complementation experiments with the corresponding in vitro synthesized mRNAs showed that the mortality of *nrz* morphants was not significantly prevented by NrzMaoB (mortality at 10 hpf: $41.2\% \pm 10.8\%$; $n = 132$), whereas NrzCytB5 prevented embryonic mortality with the same efficacy as the native Nrz protein (mortality at 10 hpf: $8.2\% \pm 4.7\%$; $n = 170$) (Figure 2D). Of note, ectopically expressed NrzCytB5 was able to prevent the constriction of the margin in *nrz* morphants (data not shown) suggesting that ER localization of Nrz is important for its function.

To further understand Nrz implication during development, we analyzed the consequences of *nrz* knockdown on the status of YSL mitochondria using Mitotracker. Indeed, in *nrz* morphants, the labeling of the YSL mitochondria with Mitotracker, was significantly decreased (Figures 2E, 2F, and 2I). Moreover, as shown by western blotting using protein extracts from purified YSL mitochondria, the loss of Nrz protein was correlated with cytochrome c release (Figure 2J). Thus, the downregulation of *nrz* expression resulted in both the dissipation of $\Delta\Psi_m$ and the release of cytochrome c from the YSL mitochondria. In *nrz* morphants, ectopic expression of either NrzCytB5 or NrzMaoB was able to prevent cytochrome c release from YSL mitochondria (Figure 2J), while NrzCytB5 was found to prevent $\Delta\Psi_m$ drop more efficiently, compared to NrzMaoB (Figures 2E–2I). Together, these results confirmed that the ER localization of Nrz is critical during early development; in addition, they suggested that the observed mitochondrial alterations could be triggered by a signal originating from the ER.

(G) Subcellular fractionation of YSL mitochondria and YSL ER of ER-GFP-expressing embryos (75% epiboly). Nrz is detected in the endoplasmic reticulum fraction (ER) and to a lesser extent in the mitochondrial fraction (Mito), being absent in the cytosolic fraction (SN). VDAC and GFP antibodies were used as mitochondrial marker and ER marker, respectively. See also Figure S1.

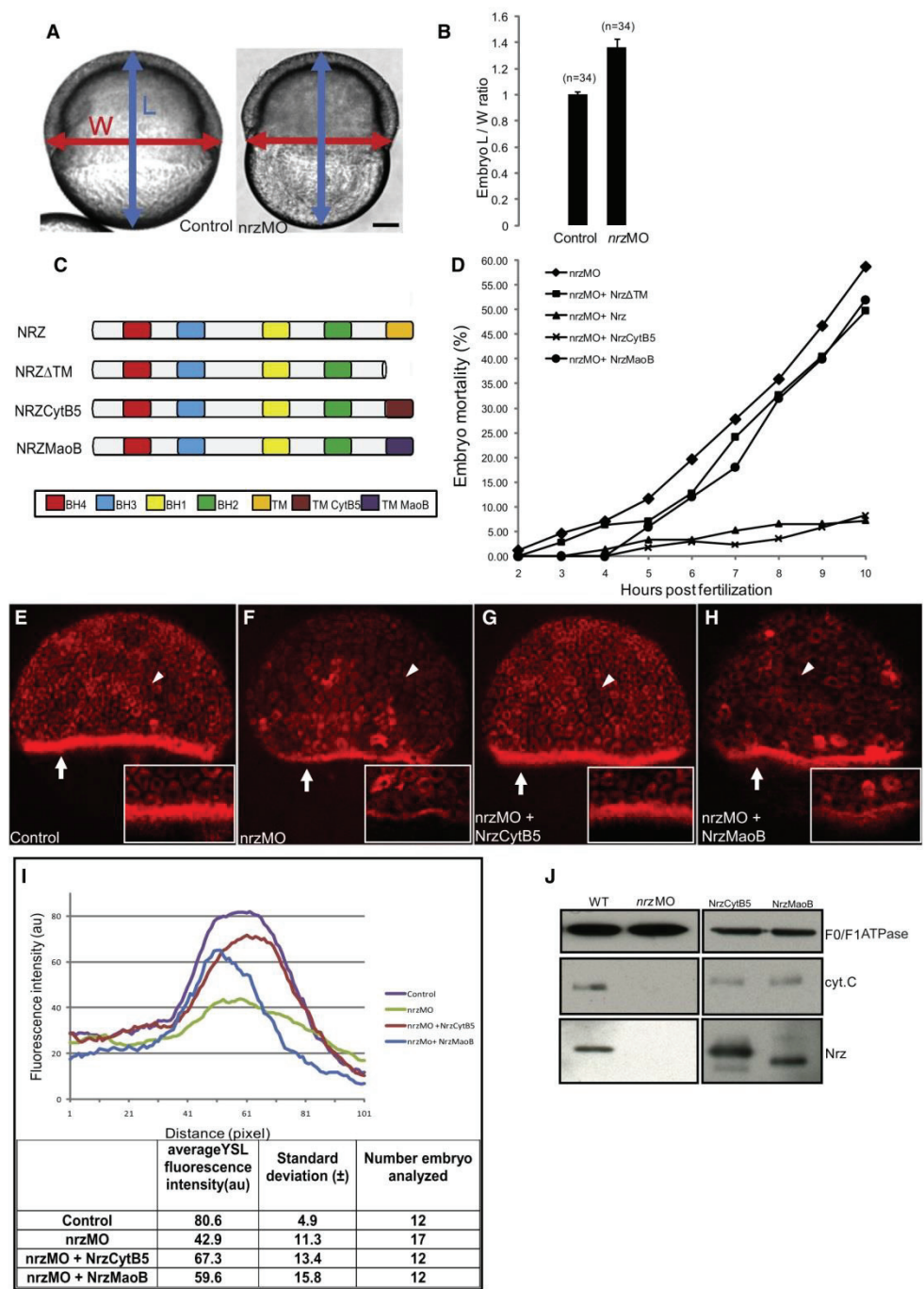


Figure 2. Effect of *nrz* Knockdown and Nrz Subcellular Localization on Epiboly and YSL Mitochondria
(A) Embryo length (L) and width (W) used for calculating the L/W ratio; left: control embryo; right: *nrz* morphant.
(B) Histogram showing the L/W ratio of control embryos (WT) and *nrz* morphants (*nrzMO*) at 50% epiboly/shield stage (mean \pm SD; three independent experiments; $p < 0.01$).

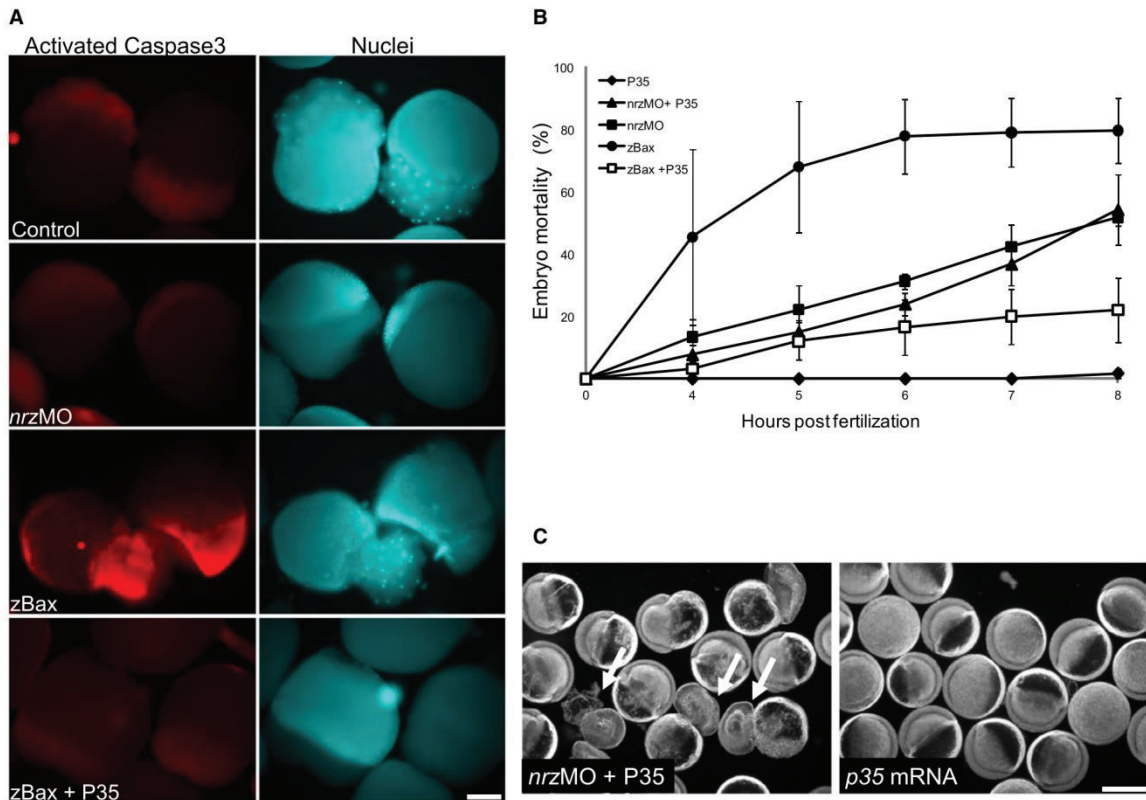


Figure 3. Nrz Knockdown Results in Caspase-Independent Epiboly Arrest

(A) Left panels: activated caspase-3 staining of embryos injected at the one cell stage with *egfp* mRNA (control), *nrzMO* (0.5 mM), *zbax* mRNA, or *zbax* mRNA plus *p35* mRNA. *Zbax*-expressing embryos were stained at the two to eight cell stage, whereas *nrz* morphants were labeled at the 30%–50% epiboly stage. Right panels: same embryos stained with Hoechst's reagent to visualize nuclei. Scale bar: 200 μ m.

(B) Mortality rate of control zebrafish embryos injected with *p35* and *zbax* mRNA either alone or in combination and of *nrz* morphants coinjected or not with *p35* mRNA (mean \pm SD; three independent experiments).

(C) Bright-field images showing the phenotype of control embryos and *nrz* morphants injected with *p35* mRNA. Scale bar: 500 μ m.

Nrz Knockdown Results in Epiboly Arrest Independently of Caspase Activation

Together, the above observations suggested that in the YSL mitochondria, the loss of Nrz protein elicited typical features of apoptosis, such as cytochrome *c* release and $\Delta\Psi_m$ dissipation. This prompted us to check whether or not the early lethal

phenotype of *nrz* morphants was the consequence of caspase activation in the YSL. To address this issue, we used a specific antibody to detect the activated form of caspase-3 in embryos at the 30%–50% epiboly stage. As depicted in Figure 3A, knockdown of *nrz* did not appear to result in caspase-3 activation at this developmental stage (0% embryos with activated

(C) Schematic drawing of recombinant proteins. Nrz, full-length protein; Nrz Δ TM, deletion mutant lacking the TM domain; NrzCytB5, swap mutant with ER-addressing domain; NrzMaoB, swap mutant with mitochondria-addressing domain. BH and TM domains are shown as color boxes.

(D) Complementation experiments: Embryos were injected with *nrz* morpholinos to dampen endogenous *nrz* level and coinjected with mRNAs expressing the recombinant proteins displayed in (C). Embryo mortality (%) was measured at indicated (hours postfertilization). Representative data from 2–8 independent experiments. The *nrz* morpholino is directed against the 5' untranslated region of the endogenous *nrz* mRNA; it does not match with the foreign *nrz* transcripts.

(E–H) Representative confocal images of Mitotracker Red-stained embryos injected with control morpholino (E), *nrzMO* morpholino (F), *nrzMO* + *nrzcytb5* mRNA (G), or *nrzMO* + *nrzmab* mRNA (H); *nrzMO*-injected embryos exhibit a dramatic decrease in the labeling of the YSL mitochondria belt (white arrows).

(I) Quantitative analysis of Mitotracker labeling of zebrafish embryos. Fluorescence intensity is represented as a function of the distance from the animal pole (upper panel). Intensity peaks in the region of the YSL. Statistical data are shown (bottom panel).

(J) Immunoblot analysis of Nrz protein and cytochrome *c* contents of purified YSL mitochondria; F0/F1 ATPase was used as a loading control. Left: mitochondrial protein extracts from control embryos and *nrz* morphants; loss of Nrz protein correlates with cytochrome *c* release. Right: same analysis carried out on *nrz* morphants coinjected with mRNAs expressing NrzCytB5 or NrzMaoB; cytochrome *c* release appears to be prevented by both Nrz swap mutants. See also Movie S1 and Figure S2.

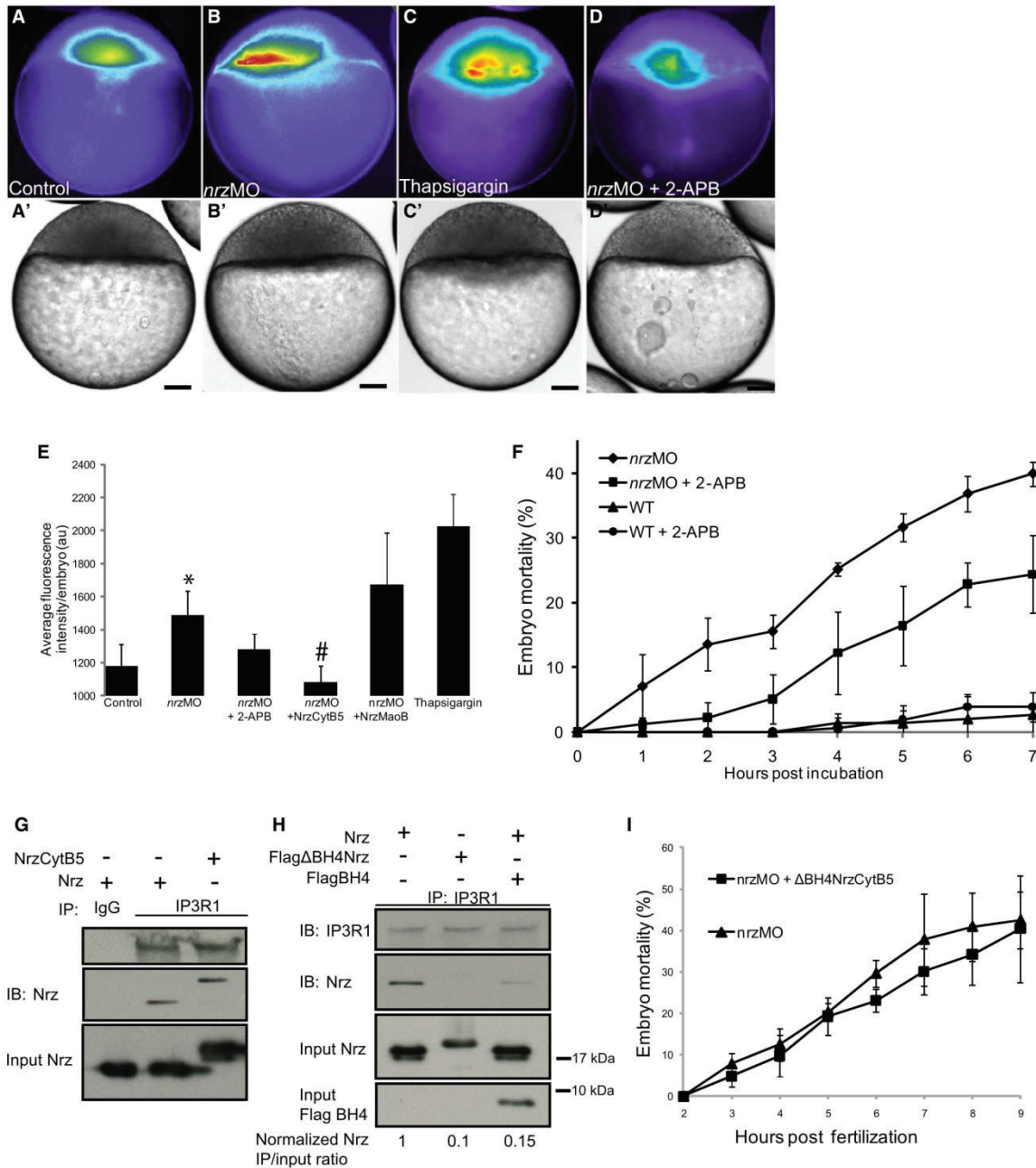


Figure 4. Nrz Binds to IP3R1 via Its BH4 Domain and Controls Intracellular Ca^{2+} Levels in Zebrafish Embryos
(A–D) Fluorescence microscopy images of control embryos (A), *nrz* morphants (B), WT embryos treated with thapsigargin (C), or *nrz* morphants treated with or without 2-APB (D); embryos were stained with Oregon Green BAPTA-1 AM (false colors, oblong-sphere stage). Increased signal in thapsigargin-treated embryos and *nrz* morphants reveals the release of free Ca^{2+} in the region of the margin from which originates the YSL. In (A'–D'), bright-field images of the same embryos are shown. Scale bar: 100 μm .
(E) Quantification of Oregon Green BAPTA-1 AM staining of control embryos and of *nrz* morphants injected or not with *nrzcytb5* or *nrzmaob* mRNAs or treated with 2-APB (50 μM); embryos treated with thapsigargin alone (20 μM) were used as positive controls (mean \pm SD; three independent experiments; * $p < 0.01$ versus control embryos; # $p > 0.9$ versus control embryos).

caspase-3, $n = 10$); in contrast, overexpression of the cell death accelerator zBax efficiently induced caspase activation as early as the four to eight cell stage (80% embryos with activated caspase-3; $n = 10$). In addition, apoptotic features downstream of caspase-3 activation such as chromatin condensation and formation of pyknotic nuclei were not observed in *nrz* morphants (data not shown). Finally, whereas the caspase inhibitor p35, prevented caspase-3 activation and subsequent embryonic lethality caused by ectopic expression of zBax, p35 was incapable to restore epiboly progression in *nrz* morphants (Figures 3B and 3C).

Together, these observations showed that, although the caspase-dependent cell death machinery already seems to be functional at early developmental stages in the zebrafish embryo, it was not activated following *nrz* knockdown. Thus, the premature arrest of epiboly observed in *nrz* morphants did not appear to be the consequence of caspase activation.

Nrz Knockdown Triggers IP3R-Dependent Intracellular Ca^{2+} Increase

The fact that the phenotype of *nrz* morphants was reverted by expressing NrzCytB5 protein was an indication of the contribution of the ER and raised the idea that Ca^{2+} flows inside the YSL might be altered following *nrz* knockdown. We thus evaluated the effect of *nrz* knockdown on the YSL Ca^{2+} levels using a dedicated fluorescent dye (Oregon Green, BAPTA-1). As shown in Figures 4A and 4B, knockdown of *nrz* resulted in a significant increase in “cytosolic” Ca^{2+} in the region of the margin (average fluorescence intensity [afi]: 1487.5 ± 146 , $n = 10$), as compared with control embryos (afi: 1177.8 ± 135.7 ; $n = 9$). This increase was observed as early as the oblong-sphere stage, shortly before the start of the epiboly process. In addition, the observed Ca^{2+} peak was fully suppressed by expression of NrzCytB5 (afi: 1083.3 ± 96.1 , $n = 10$), which was previously found to prevent the premature death of *nrz* morphants, contrary to NrzMaoB (afi: 1674.1 ± 311 ; $n = 10$), which was unable to restore the viability of *nrz* morphants (Figure 4E, see also Figure 2D). To further establish that the increase of YSL Ca^{2+} concentration is a causal event of the observed epiboly arrest in *nrz* morphants, zebrafish embryos were treated with the SERCA inhibitor thapsigargin (512 cell stage), which is routinely used to induce cytosolic Ca^{2+} accumulation in cultured cells. As shown in Figure 4C, thapsigargin treatment led to massive increase in Ca^{2+} concentration in the YSL, as similarly observed in *nrz* morphants. Moreover, embryos incubated with thapsigargin (5–20 μM) exhibited delayed epiboly; however, a limited number of embryos died prematurely, compared with *nrz* morphants (less than 5%, data not shown). Direct injection of thapsigargin into the YSL at the sphere-oblong stage considerably increased the rate of early mortality. Interestingly, thapsigargin treatment also

led to $\Delta\Psi_m$ drop and cytochrome c release, thus phenocopying *nrz* morphants (Figures S5A–S5C).

As the observed Ca^{2+} increase in *nrz* morphants seems to originate from the ER we investigated the implication of the major calcium channel IP3R in the *nrz* knockdown phenotype. For this purpose, *nrz* morphants were incubated with the IP3R inhibitor 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). Prolonged treatment of embryos with 2-APB throughout epiboly significantly delayed epiboly progression (Figure S3D); thus, *nrz* morphants were transiently incubated with 2-APB (from 512 cells to oblong stage). In such conditions, as shown in Figures 4D and 4E, 2-APB treatment prevented the increase of Ca^{2+} levels in *nrz* morphants (afi: 1195.6 ± 155 ; $n = 19$). Moreover, as shown in Figure 4F, early mortality was significantly reduced in *nrz* morphants upon 2-APB treatment (*nrz*MO embryos: mortality at 10 hpf = $39.9\% \pm 1.9\%$; 2-APB treated *nrz*MO embryos: mortality at 10 hpf = $24.4\% \pm 6\%$). Interestingly, heparin as well as Xestospongin C, two other inhibitors of IP3R, have a similar effect (Figures S3E and S3F). This suggested that the Ca^{2+} increase observed in *nrz* morphants is IP3R dependent.

Nrz Interacts with the IP3R1 Channel via Its BH4 Domain

It was previously shown that the Bcl-2 protein can regulate cytosolic Ca^{2+} concentrations via its interaction with the IP3R1 Inositol 1,4,5-triphosphate receptor channel; moreover, Bcl-2 was reported to interact directly with IP3R1 via its BH4 domain (Rong et al., 2009). To directly check if Nrz was able to repress the opening of the IP3R1 channel, the effect of Nrz on the release of calcium originating from the ER was studied in HeLa cells following histamine treatment, which is known to trigger calcium release into the cytosol by increasing intracellular IP3 levels. Indeed, full-length Nrz, as well as NrzCytB5, but not $\Delta\text{BH4NrzCytB5}$, prevented histamine-dependent Ca^{2+} release (Figures S3G and S3H). To check if Nrz interacted with IP3R1 via its BH4 domain, a series of Nrz mutants were expressed in HeLa cells, Nrz/IP3R1 interactions being detected by co-immunoprecipitation and western blotting. As shown in Figure 4G, whole-length Nrz did interact with IP3R1 as well as ER-addressed NrzCytB5; in contrast, no interaction could be detected with ΔBH4Nrz , whereas the BH4 domain alone appeared to disrupt Nrz/IP3R1 interaction (Figure 4H). Finally, the fact that in *nrz* morphants, contrary to full-length NrzCytB5 (Figure 2B), $\Delta\text{BH4NrzCytB5}$ neither restored epiboly progression (Figure 4I) nor prevented the increase of Ca^{2+} in the YSL (data not shown) was an indication that the observed interaction between IP3R1 and Nrz was of functional significance.

Nrz Knockdown Alters the Cytoskeleton in the Yolk Cell

The yolk cell and in particular the YSL is a dynamic structure containing a broad range of cytoskeleton components that organize

(F) Effect of IP3R inhibition with 2-APB on the mortality of zebrafish embryos. Control embryos (WT) and *nrz* morphants (MO) were incubated or not with 2-APB (50 μM) from 512 cells to oblong-sphere stage. Mortality was evaluated at indicated times after the beginning of the incubation (mean \pm SD; three independent experiments).

(G and H) Immunoprecipitation experiments with protein extracts from transfected HeLa cells: Nrz and NrzCytB5 coimmunoprecipitated with the IP3R1 channel (G); Nrz but not ΔBH4Nrz was able to interact with IP3R1 (H); the Flag-tagged BH4 peptide domain inhibited Nrz/IP3R1 interaction. Bottom: densitometry quantification, Nrz IP/input ratios obtained by calculating the ratio of IP band intensity (lanes “IB:Nrz”) to the input band intensity (lanes “Input Nrz”).

(I) Time course analysis of *nrz* morphants injected or not with in vitro synthesized $\Delta\text{BH4NrzCytB5}$ mRNA. Ectopic expression of $\Delta\text{BH4NrzCytB5}$ is unable to prevent *nrz*MO lethal phenotype (mean \pm SD; three independent experiments). See also Figure S3.

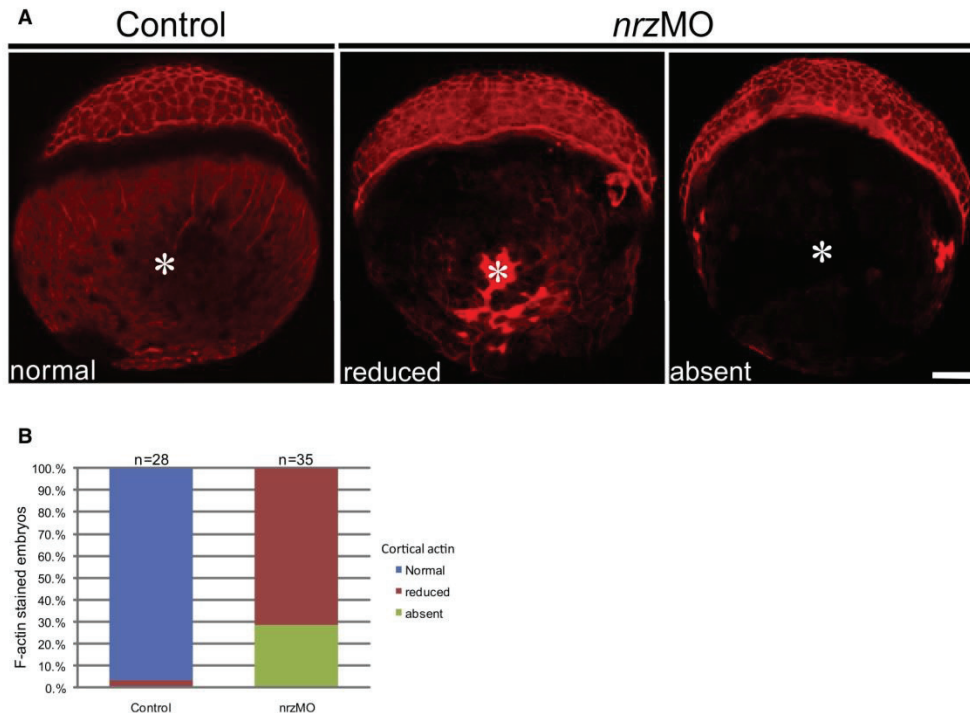


Figure 5. *Nrz* Knockdown Leads to Profound Alterations of the Cytoskeleton Inside the Yolk Cell

(A) F-actin staining in control embryos and *nrz* morphants at 40%–50% epiboly stage showing the status of cortical F-actin inside the vegetal pole (white asterisk). In *nrz* morphants, cortical actin is severely reduced or absent.

(B) Histogram showing the percentage of control embryos versus *nrz* morphants at 50% epiboly stage with normal (blue), reduced (red), or absent (green) cortical F-actin. See also Figure S4.

into complex networks of microtubules and microfilaments (cortical F-actin, actin-myosin ring). These networks actively drive epiboly progression during early development (Cheng et al., 2004; Koppen et al., 2006). Ca^{2+} is a major intracellular messenger that controls a variety of cellular processes including cytoskeleton remodeling and morphogenesis; it plays a critical role throughout the development of the zebrafish (Ashworth et al., 2007; Gilland et al., 1999; Webb and Miller, 2006; Westfall et al., 2003). Ca^{2+} fluxes in the vicinity of the margin were recently suggested to participate in epiboly (for review, see Webb and Miller, 2006). Thus, the effect of *nrz* knockdown on the cytoskeleton of the yolk cell was analyzed. Microtubules appeared to be intact in the blastomeres of *nrz* morphants. In contrast, the microtubule network was dramatically disorganized in the yolk cell; this effect being prevented by the microtubule stabilizing agent Taxol (Figures S4A–S4C). However Taxol did not prevent the mortality of *nrz* morphants (data not shown). This suggested that *Nrz* was required for the YSL microtubule stability during epiboly but that the observed disorganization of the microtubule network in the yolk cell of *nrz* morphants was the consequence rather than the cause of early embryonic mortality.

We then analyzed the effect of *nrz* knockdown on the organization of the F-actin network using phalloidin-rhodamine

staining. In control embryos, a diffuse signal was detected in the yolk cell, corresponding to cortical actin (Cheng et al., 2004). Remarkably, this signal was severely altered, being reduced (71.4%, $n = 35$) or even suppressed (28.6%) in *nrz* morphants as compared to control embryos (96.4% normal, $n = 28$) (Figure 5). The observed cortical actin disruption appeared to be possibly due to both F-actin depolymerization and partial proteolytic degradation (Figure S4D).

Thus, knockdown of *nrz* resulted in alterations both in actin microfilaments and microtubules in the yolk cell. By contrast, in the animal pole, apart from the blastomeres in direct contact with the margin, the overall organization of the cytoskeleton did not seem to have been altered (Figures 5 and S4D).

Effect of *nrz* Knockdown Triggers MLCK-Dependent Actin-Myosin Complex Formation at the Margin

During zebrafish development an actin-myosin ring forms at 75% epiboly and plays an essential role in epiboly progression and blastopore closure (Cheng et al., 2004; Rohde and Heisenberg, 2007). This raised the possibility that in *nrz* morphants, the observed constriction of the margin could be due to premature formation of the actin-myosin complex. Indeed, as shown in Figure 6A, the actin-myosin ring had already appeared

when the margin reached the yolk cell equator (50% epiboly), whereas in control embryos this structure was not present until 75% epiboly. It should be noted that the treatment of *nrz* morphants with the selective myosin II inhibitor blebbistatin, significantly delayed the constriction of the margin in *nrz* morphants (data not shown). These observations suggested that in *nrz* morphants, the constriction of the actin-myosin ring was accelerated, whereas the speed of progression of the margin down to the vegetal pole was unchanged. Importantly, thapsigargin-treated embryos exhibited similar early margin constriction as well as premature formation of the actin-myosin ring (Figure 6A), suggesting that in *nrz* morphants as well, these events are the consequence of massive Ca^{2+} release from the ER inside the yolk cell. Finally, overexpression of Nrz appeared to prevent the formation of the actin-myosin ring and delay epiboly (Figure S5).

At the molecular level, the formation of the actin-myosin complex is triggered by the phosphorylation of MLC subunits (Thr-18 and Ser-19 residues) (Matsumura, 2005). We thus analyzed MLC phosphorylation in *nrz* morphants by immunofluorescence and western blotting, using an antibody specific for phosphorylated Ser-19. Remarkably, at 50% epiboly, such phosphorylation was observed at the leading edge of the margin in *nrz* morphants (actin-myosin ring positive embryos = 76.9%, $n = 13$), but not in control embryos (0%, $n = 14$) (Figure 6B). In addition, protein extracts from *nrz* morphants showed increased myosin phosphorylation (Figure 6C), raising the possibility that the formation of the actin-myosin ring in *nrz* morphants may be the consequence of premature phosphorylation of MLC. Interestingly, thapsigargin treatment of zebrafish embryos induced a similar increase of Ser-19 phosphorylation in a dose dependant manner (Figure 6C), suggesting that MLC phosphorylation depends on the release of Ca^{2+} from the ER inside the YSL.

Two main kinases are capable of phosphorylating MLC directly at Ser-19: MLCK and Rho-associated protein kinase 1/2 (ROCK 1/2) (Matsumura, 2005; Takashima, 2009; Totsukawa et al., 2000). In zebrafish, these kinases are both expressed during early development (Blaser et al., 2006). We thus evaluated their involvement in the phenotype of *nrz* morphants, using specific inhibitors. As shown in Figure 6D, incubation with the MLCK inhibitor ML-7 slowed down the mortality of *nrz* morphants significantly (mortality at 7 hpf = $4.4\% \pm 6.2\%$, $n = 59$), whereas the ROCK inhibitor Y26732 had little or no effect (mortality at 7 hpf = $23.8\% \pm 8.3\%$, $n = 62$). In addition, the MLCK inhibitor ML-7 (actin ring positive embryos [RPE] = 20%, $n = 15$), as well as the calmodulin antagonist W13 (RPE = 14.3%, $n = 14$), prevented MLC phosphorylation and premature actin ring formation in *nrz* morphants (Figure 6B), contrary to Y26732, which had no effect (RPE = 75%, $n = 12$). Together, these results suggested that calmodulin-dependent MLCK activity was required for premature formation of the actin-myosin ring observed in *nrz* morphants.

Altogether, these data indicated that *nrz* invalidation results in the massive release of Ca^{2+} from ER stores, which then triggers MLC phosphorylation via MLCK. As a result, the formation of the contractile actin-myosin ring occurs prematurely, leading to the detachment of the blastomeres from the yolk cell and death of the embryo (Figure 7).

DISCUSSION

In the zebrafish, epiboly is driven by the cytoskeletal dynamics of the YSL and of the migrating blastomeres as well as presumably by active endocytosis events at the level of the blastomere plasma membrane. The formation of a contractile actin-myosin ring, in the region of the margin, is critical for epiboly completion (Solnica-Krezel, 2006). These events seem to be orchestrated in part by Ca^{2+} transients, the underlying molecular mechanisms remaining largely unknown (Webb and Miller, 2006).

Effect of *nrz* Knockdown on YSL Mitochondria

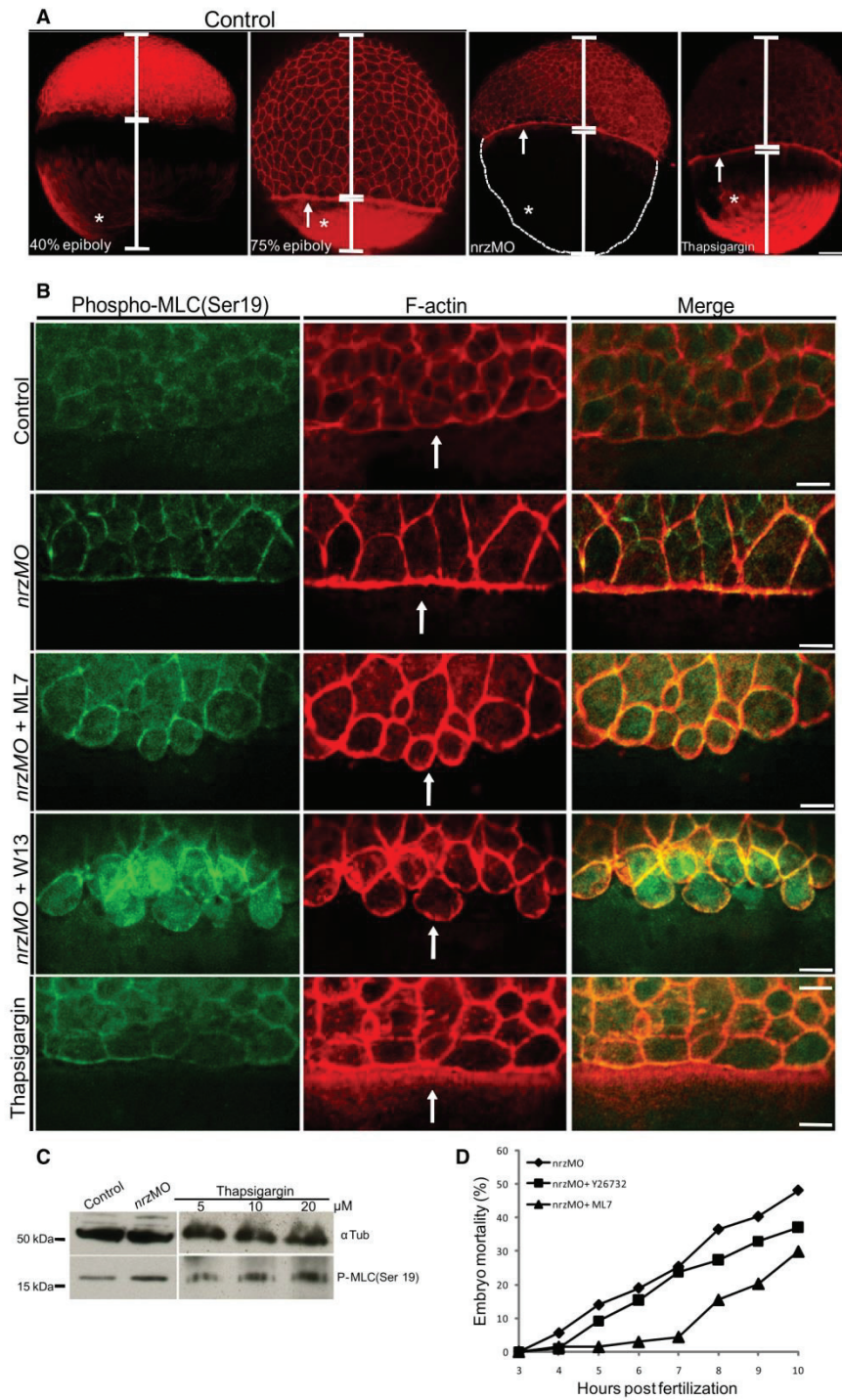
We previously showed that the knockdown of the apoptosis inhibitor *nrz* led to premature epiboly arrest. In the zebrafish embryo, the *nrz* transcript is specifically accumulated in the YSL. Here, we demonstrate that the YSL contains a dense ER network and a large number of active mitochondria. Our results show that Nrz protein is localized to both YSL ER and mitochondria.

Of note, *nrz* knockdown affects the TM potential of YSL mitochondria, and to a lesser extent of the blastomere mitochondria. The observed $\Delta\Psi_m$ dropdown is accompanied by the release of cytochrome *c* but not by any detectable activation of caspase-3. However, expression of the caspase inhibitor p35 could not prevent the early mortality caused by *nrz* downregulation. Thus, the phenotype caused by the knockdown of *nrz* appears to be caspase independent.

Effect of *nrz* Knockdown on Ca^{2+} Fluxes in the YSL

The localization of Nrz in the ER, but not in mitochondria, is critical for the proper early development of the embryo. Indeed, *nrz* knockdown leads to a marked increase in cytosolic Ca^{2+} levels in the YSL, which is prevented by ectopically expressed ER-addressed NrzCytB5, but not by mitochondria-addressed NrzMaoB. Moreover, artificial increase of free Ca^{2+} in the YSL upon thapsigargin treatment of zebrafish embryos phenocopies *nrz* morphants. Of note, thapsigargin treatment also results in a decrease in transmembrane potential of YSL mitochondria and triggers cytochrome *c* release. The interplay between Ca^{2+} signaling and mitochondrial status has been extensively studied; mitochondria are capable of storing substantial amounts of Ca^{2+} , thus playing the role of intracellular Ca^{2+} buffer (Rizzuto et al., 2009). Treating the cells, including thapsigargin, with cytotoxic agents, triggering a massive release of Ca^{2+} into the cytosol generally ends in cell death (Rong and Distelhorst, 2008). Calcium waves observed in *nrz* morphants seem to originate from the margin, thus affecting primarily YSL mitochondria. However, blastomere mitochondria may be also affected due to Ca^{2+} entry from the YSL via the gap junctions located into their plasma membrane (Webb and Miller, 2006).

The effects of Bcl-2 family members on intracellular Ca^{2+} fluxes are still under active investigation. It has been reported that Bcl-2 and Bcl-xL could increase calcium leak from the ER thus reducing the amount of calcium available for inducing apoptosis (White et al., 2005; Rizzuto et al., 2009). Alternatively, Bcl-2 was shown to interact with the IP3R1 Ca^{2+} channel and prevent the release of Ca^{2+} from the ER thus preventing Ca^{2+} overloading of the mitochondria and downstream apoptosis events (Rong et al., 2009).



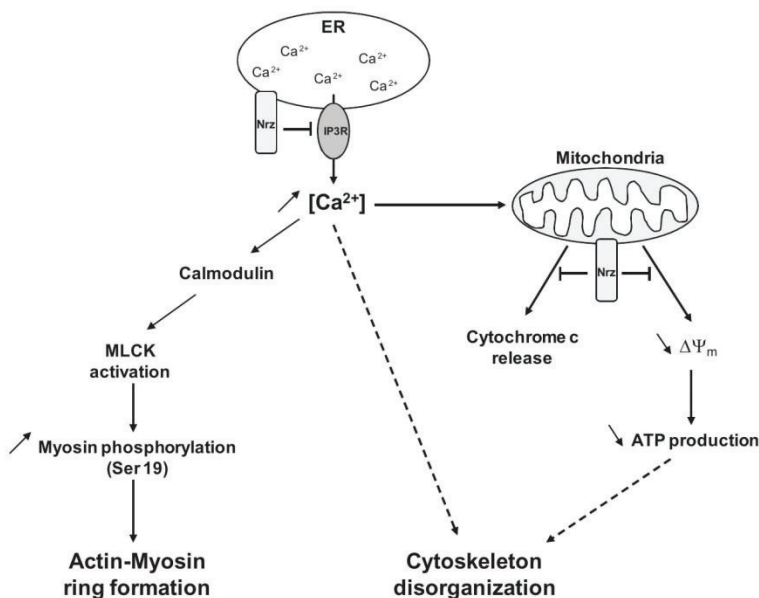


Figure 7. A Model for the Role of Nrz in the YSL during Zebrafish Development

Nrz located to the ER is critical for the regulation of YSL Ca^{2+} fluxes. Nrz knockdown increases YSL free Ca^{2+} levels, leading to MLC hyperphosphorylation presumably via calmodulin/MLCK pathway, premature actin-myosin ring formation, and subsequent YSL cytoskeletal breakdown. Ca^{2+} may also directly lead to microtubule depolymerization, as their stability is compromised in the presence of increased Ca^{2+} levels. Another consequence of free Ca^{2+} increase is the alteration of the YSL mitochondria as shown by $\Delta\Psi_m$ loss and cytochrome c release. The alteration of the mitochondrial status may also contribute to cytoskeletal disorganization due to decreased production of ATP into the YSL.

Our data suggest that Nrz regulates YSL Ca^{2+} levels by interacting with the IP3R1 channels via its BH4 domain. This interaction appears to occur between the BH4 domain of Nrz and IP3R1. Whether this effect on YSL Ca^{2+} levels occurs exclusively in an IP3R-dependent manner or by an additional mechanism will require further studies.

Effect of *nrz* Knockdown on Cytoskeletal Dynamics in the YSL

The YSL contains a large number of cytoskeletal proteins that drive in part epiboly morphogenic movements (Cheng et al., 2004; Koppen et al., 2006). In *nrz* morphants, the microtubule network and F-actin vegetal actin are dramatically affected, which might result from a decrease in ATP concentrations in the yolk cell due to alterations of YSL mitochondria (Figures 2E–2J). However, these cytoskeletal modifications are more likely to be consequences rather than the actual cause of early mortality since they occur after the constriction of the margin. Our results suggest that the constriction of the margin and subsequent embryonic death are due to the premature formation

of the contractile actin-myosin ring. Indeed, the contractile ring normally forms after the EVL reaches the equator (75% epiboly), which favors epiboly completion (Solnica-Krezel, 2006). In *nrz* morphants, the formation of the actin myosin ring occurs before the EVL reaches the equator, resulting in the detachment of the entire embryo from the yolk. Importantly, premature formation of the actin myosin ring is correlated with increased phosphorylation of MLC on Ser-19, which is known to enhance myosin ATPase activity and stress fibers formation (Totsukawa et al., 2000). The effect of the two pharmacological agents ML7 and Y26732 suggest that the inhibition of MLCK, but not ROCK1/2, significantly delays margin constriction and early mortality of *nrz* morphants. In the smooth muscle, MLCK activation and myosin phosphorylation are Ca^{2+} dependent. The release of Ca^{2+} from the ER leads to the activation of the Ca^{2+} -dependent calmodulin protein, which subsequently binds and activates MLCK (Matsumura, 2005). We show here that W-13 treatment of *nrz* morphants inhibits premature actin-myosin ring formation, suggesting that similar calmodulin-dependent MLCK activation occurs at the margin.

In *nrz* morphants, the rise in Ca^{2+} levels leads to mitochondrial dysfunction and increased MLC phosphorylation by MLCK. Thus, it turns out that in addition to Nrz, the formation of the contractile ring is under the control of a multiplicity of factors,

Figure 6. Nrz Knockdown Leads to Increased Myosin Phosphorylation at the Margin and Premature Actin-Myosin Contractile Ring Formation

(A) F-actin staining of control embryos (40% and 75% epiboly), *nrz* morphants (*nrz*MO), and thapsigargin-treated (5 μM) embryos. In control embryos, the actin-myosin ring is present at 75% epiboly but absent at 40% epiboly (white arrows). In *nrz* morphants the actin-myosin ring is already present before migrating blastomeres reached the equator. White asterisks materialize the location of vegetal F-actin inside the yolk cell. Scale bar: 100 μm .
(B) Immunofluorescence analysis of the margin region of 50% epiboly stage embryos: staining of phospho-MLC of *nrz* morphants versus control embryos showing MLC phosphorylation at the margin in *nrz* morphants, which is correlated with an increase in the F-actin signal (phalloidin staining). Merged images are shown on the right. Treatment of *nrz* morphants with the MLCK inhibitor ML7 or the calmodulin antagonist W13 inhibits MLC phosphorylation and F-actin polymerization. Thapsigargin-treated embryos were used as positive controls. Scale bar, 20 μm . Representative data from at least three embryos (50% epiboly).
(C) Immunoblot analysis of the phospho-MLC (Ser-19) content in the blastoderm of control embryos, *nrz* morphants, and embryos treated with increasing amounts of thapsigargin.
(D) Effect of ROCK inhibitor Y26732 (50 μM) and MLCK inhibitor ML7 (20 μM) on the mortality of *nrz* morphants. Mortality of ML7-treated embryos 7 hpf results in blastomere detachment due to the lack of actin-myosin ring formation. Representative results from three independent experiments are shown. See also Figure S5.

including the MTX2 transcription factor (Wilkins et al., 2008), the MAPKAPK2 protein kinase (Holloway et al., 2009), the Ste20 like kinase MSN1 (Koppen et al., 2006), and the mDIA2 formin (Lai et al., 2008). Understanding of the interplay between the signaling pathways involved remains a major issue.

The Bcl-2 Family of Proteins as Regulators of Cytoskeleton Dynamics

Why the release of cytochrome *c* from the YSL mitochondria does not result in caspase activation remains an open question. The possibility exists that phosphorylation of MLC occurs shortly after the release of Ca^{2+} such that the contraction of the actin-myosin ring and subsequent separation of the blastomeres from the yolk cell may occur before caspases can be activated. This then raises the possibility that the Bcl-2 family of apoptosis regulators, via their effect on Ca^{2+} signaling, may indeed have multiple roles into the cell when apoptosis is silenced.

Actually, there may be a dual role for Nrz during epiboly, first in the ER, where it may participate, as shown in this report, in fine-tuning of the Ca^{2+} fluxes and ensure the formation of the actin ring at the right time; second, in the YSL mitochondria, where, possibly by enhancing their Ca^{2+} uptake capacity (see Murphy et al., 1996), it may preserve mitochondrial integrity by avoiding $\Delta\Psi_m$ drop and preventing cytochrome *c* release. Indeed, this could explain the observed capacity of NrzMaoB to prevent mitochondrial dysfunction in *nrz* morphants. Nrz may also prevent unwanted apoptotic events that may otherwise be triggered when the blastomeres merge and give rise to the YSL. Indeed, there is evidence that syncytium formation favors apoptosis spreading (Greenwood and Gautier, 2005; Huppertz et al., 2001). Finally, Nrz might be critical for the contribution of YSL mitochondria to the regulation of Ca^{2+} transients throughout epiboly.

Thus, our results suggest that Bcl-2 family members, in addition to their role in controlling apoptosis, may play a pivotal role in remodeling the cytoskeleton during cell migration, epithelial mesenchymal transition, and possibly metastasis formation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Embryo Manipulation

Morpholino (0.5 mM) and mRNA (100 ng/ μl) injections were performed at one to four cell stages. Thapsigargin (5–20 μM) was incubated at 1000 cell stage for 3 hr or injected in the YSL at oblong-sphere stage. ML-7 (20 μM), Y27632 (50 μM), and W-13 (100 μM) were incubated at oblong-sphere stage. For embryo mortality quantification, 50 μM 2-APB was added before MBT for 45 min (between 512 cells and oblong stage), which did not cause any significant early epiboly delay. After incubation, embryos were washed with egg water and mortality was evaluated.

Immunofluorescence Analysis and In Vivo Staining

Image acquisition was carried out with the same gain, amplification, and exposure time between each experimental condition and the corresponding control. Image analysis was done using ImageJ software. All the procedures were carried out at room temperature unless otherwise stated. For Ca^{2+} dynamics experiments, one cell stage embryos were injected with 10 μM Oregon Green 488 BAPTA-1 AM and analyzed at high stage using Nikon TE300 fluorescence microscope. Double phosphomyosin/F-actin and Nrz staining were carried out as described (Koppen et al., 2006). In brief, embryos at the desired stage were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C and washed in 0.1% Triton in PBS (PBT). They were then permeabilized for 1 hr in 0.5% Triton in PBS and subsequently incubated in block solution (10% normal goat serum, 1% DMSO, 0.1% Triton in PBS). Embryos were then incubated

overnight at 4°C with 1/100 rabbit antiphospho-MLC 2 Ser-19 or 1/100 rabbit anti-Nrz antibody. Following three washes in PBT, embryos were incubated in Phalloidin and/or secondary antibodies and incubated overnight at 4°C. In vivo active mitochondria staining was performed by incubating embryos at the 40% epiboly stage with Mitotracker Red (500 nM) in egg water for 30 min at 28.5°C. Embryos were then washed extensively with egg water and visualized using a confocal microscope Axiovert 100M LSM510. The YSL ER was visualized in vivo by injecting 100 μM ER tracker at one cell stage or injecting *egfpctb5* mRNA. Activated caspase-3 staining was performed as described (Jette et al., 2008).

Subcellular Fractionation

All steps were carried out at 4°C if not otherwise stated. Mitochondria and ER localized to the YSL were purified as follows: approximately 100–150 embryos were put in 1 ml cold MB buffer (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES [pH 7.5] containing proteases inhibitors) and the yolk sac disrupted with a P1000 tip. Embryos were then shaken for 5 min at 1100 rpm to dissolve the yolk and then centrifuged 2 min at 300 $\times g$ to pellet the blastomeres. The supernatant was centrifuged at 1500 $\times g$ twice for 5 min each to eliminate yolk nuclei and then centrifuged at 10,600 $\times g$ for 5 min. The pellet containing mitochondria was washed once with MB buffer and prepared for further analyses. The supernatant was then centrifuged at 100,000 $\times g$ for 1 hr. The supernatant containing cytosolic fraction was conserved and the pellet was resuspended in RIPA buffer for further analyses.

For HeLa cell fractionation, cells at 90% confluence in 10 cm^2 plates were transfected with pCS2+-NrzCytB5 or pCS2+-NrzMaoB using lipofectamine transfection reagent. Twenty-four hours after transfection, mitochondria were purified using the Qproteome Mitochondria Isolation Kit (QIAGEN) according to manufacturer recommendation. After mitochondria isolation, the ER was purified from the supernatant as described above.

Immunoprecipitations and Immunoblotting

For IP3R/Nrz coimmunoprecipitation experiments, 4 $\times 10^6$ HeLa cells were transfected with the corresponding vector. Cells were then lysed in TNE buffer (10 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA [pH 7.4], 1 mM β glycerophosphate, 1 mM orthovanadate, 0.1 mM sodium pyrophosphate containing protease inhibitors). Extracts were precleared with protein G-Sepharose beads for 1 hr and then incubated with 6 μg of primary anti-IP3R antibody. Extracts were then incubated with protein G-Sepharose beads for 2 hr. Immunoprecipitated fractions were washed five times with TNE and analyzed by immunoblotting. For yolk cortical actin, immunoprecipitation experiments were carried out on yolk fractions (see below) obtained from embryos at 40%–50% epiboly stage. Four micrograms of primary anti- α -actin antibody were used for the immunoprecipitation.

Ser-19 phosphorylation status of MLC was done on extracts from blastomeres separated from the yolk as described (Link et al., 2006). Proteins were extracted in RIPA buffer (1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS in PBS, containing protease and phosphatase inhibitors) and analyzed using anti-phospho-MLC (Ser-19) antibody (1/500 dilution). Detection of Nrz and cytochrome *c* was performed on protein extracts from isolated YSL mitochondria (50 embryos/ lane), using anti-Nrz (1/200) and anti-cytochrome *c* (1/500) antibodies.

Statistical Analysis

Error bars displayed on graphs represent mean \pm SD of three independent experiments. Statistical significance was analyzed using Student's *t* test; $p < 0.01$ was considered significant.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, Supplemental References, five figures, and one movie and can be found with this article online at doi:10.1016/j.devcel.2011.03.016.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge A. Cornut for technical assistance as well as P. Gonzalo, J. Lopez, and A. Auouacheria for stimulating discussions. This work was

supported ARC and Ligue contre le Cancer. N.P. and B.B. are fellows from the Ministère de la Recherche.

Received: September 14, 2010

Revised: February 2, 2011

Accepted: March 21, 2011

Published: May 16, 2011

REFERENCES

- Arnaud, E., Ferri, K.F., Thibaut, J., Haftek-Terreau, Z., Auouacheria, A., Le Guellec, D., Lorca, T., and Gillet, G. (2006). The zebrafish bcl-2 homologue Nr2 controls development during somitogenesis and gastrulation via apoptosis-dependent and -independent mechanisms. *Cell Death Differ.* 13, 1128–1137.
- Ashworth, R., Devogelaere, B., Fabes, J., Tunwell, R.E., Koh, K.R., De Smedt, H., and Patel, S. (2007). Molecular and functional characterization of inositol triphosphate receptors during early zebrafish development. *J. Biol. Chem.* 282, 13984–13993.
- Bivona, T.G., Quatela, S.E., Bodemann, B.O., Ahearn, I.M., Soskis, M.J., Mor, A., Miura, J., Wiener, H.H., Wright, L., and Saba, S.G. (2006). PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol. Cell* 21, 481–493.
- Blaser, H., Reichman-Fried, M., Castanon, I., Dumstrei, K., Marlow, F.L., Kawakami, K., Solnica-Krezel, L., Heisenberg, C.P., and Raz, E. (2006). Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev. Cell* 11, 613–627.
- Chen, R., Valentia, I., Zhong, F., McColl, K.S., Roderick, H., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Conway, S.J., Holmes, A.B., Mignery, G.A., et al. (2004). Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Cell Biol.* 166, 193–203.
- Chen, Z.X., and Pervaiz, S. (2010). Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. *Cell Death Differ.* 17, 408–420.
- Cheng, J.C., Miller, A.L., and Webb, S.E. (2004). Organization and function of microfilaments during late epiboly in zebrafish embryos. *Dev. Dyn.* 231, 313–323.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* 37, 299–310.
- de Moissac, D., Mustapha, S., Greenberg, A.H., and Kirshenbaum, L.A. (1998). Bcl-2 activates the transcription factor NF-kappaB through the degradation of the cytoplasmic inhibitor I-kappaBalpha. *J. Biol. Chem.* 273, 23946–23951.
- Gilland, E., Miller, A.L., Karplus, E., Baker, R., and Webb, S.E. (1999). Imaging of multicellular large-scale rhythmic calcium waves during zebrafish gastrulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 157–161.
- Greenwood, J., and Gautier, J. (2005). From oogenesis through gastrulation: developmental regulation of apoptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 215–224.
- Hengartner, M.O., and Horvitz, H.R. (1994). C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 76, 665–676.
- Holloway, B.A., Gomez de la Torre Canny, S., Ye, Y., Slusarski, D.C., Freisinger, C.M., Dosch, R., Chou, M.M., Wagner, D.S., and Mullins, M.C. (2009). A novel role for MAPKAPK2 in morphogenesis during zebrafish development. *PLoS Genet.* 5, e1000413.
- Huppertz, B., Tews, D.S., and Kaufmann, P. (2001). Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. *Int. Rev. Cytol.* 205, 215–253.
- Jette, C.A., Flanagan, A.M., Ryan, J., Pyati, U.J., Carbonneau, S., Stewart, R.A., Langenau, D.M., Look, A.T., and Letai, A. (2008). BIM and other BCL-2 family proteins exhibit cross-species conservation of function between zebrafish and mammals. *Cell Death Differ.* 15, 1063–1072.
- Jiao, J., Huang, X., Feit-Leithman, R.A., Neve, R.L., Snider, W., Darrt, D.A., and Chen, D.F. (2005). Bcl-2 enhances Ca(2+) signaling to support the intrinsic regenerative capacity of CNS axons. *EMBO J.* 24, 1068–1078.
- Koppen, M., Fernandez, B.G., Carvalho, L., Jacinto, A., and Heisenberg, C.P. (2006). Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and Drosophila. *Development* 133, 2671–2681.
- Kowaltowski, A.J., and Fiskum, G. (2005). Redox mechanisms of cytoprotection by Bcl-2. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 508–514.
- Lai, S.L., Chan, T.H., Lin, M.J., Huang, W.P., Lou, S.W., and Lee, S.J. (2008). Diaphanous-related formin 2 and profilin 1 are required for gastrulation cell movements. *PLoS ONE* 3, e3439.
- Lam, S.H., Wu, Y.L., Vega, V.B., Miller, L.D., Spitsbergen, J., Tong, Y., Zhan, H., Govindarajan, K.R., Lee, S., Mathavan, S., et al. (2006). Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nat. Biotechnol.* 24, 73–75.
- Lieschke, G.J., and Currie, P.D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8, 353–367.
- Link, V., Shevchenko, A., and Heisenberg, C.P. (2006). Proteomics of early zebrafish embryos. *BMC Dev. Biol.* 6, 1.
- Matsumura, F. (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol.* 15, 371–377.
- Murphy, A.N., Bredesen, D.E., Cortopassi, G., Wang, E., and Fiskum, G. (1996). Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9893–9898.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., et al. (2009). Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1342–1351.
- Rohde, L.A., and Heisenberg, C.P. (2007). Zebrafish gastrulation: cell movements, signals, and mechanisms. *Int. Rev. Cytol.* 261, 159–192.
- Rong, Y., and Distelhorst, C.W. (2008). Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 73–91.
- Rong, Y.P., Bultynck, G., Aromolaran, A.S., Zhong, F., Parys, J.B., De Smedt, H., Mignery, G.A., Roderick, H.L., Bootman, M.D., and Distelhorst, C.W. (2009). The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 14397–14402.
- Shestopalov, I.A., and Chen, J.K. (2010). Oligonucleotide-based tools for studying zebrafish development. *Zebrafish* 7, 31–40.
- Shibasaki, F., Kondo, E., Akagi, T., and McKeon, F. (1997). Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature* 386, 728–731.
- Shirane, M., and Nakayama, K.I. (2003). Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 28–37.
- Solnica-Krezel, L. (2006). Gastrulation in zebrafish—all just about adhesion? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 433–441.
- Takashima, S. (2009). Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction. *Circ. J.* 73, 208–213.
- Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A., and Reed, J.C. (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80, 279–284.
- Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D.J., Sasaki, Y., and Matsumura, F. (2000). Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* 150, 797–806.
- Wang, C., and Youle, R.J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu. Rev. Genet.* 43, 95–118.
- Wang, H.G., Miyashita, T., Takayama, S., Sato, T., Torigoe, T., Krajewski, S., Tanaka, S., Hovey, L., 3rd, Troppmair, J., Rapp, U.R., et al. (1994). Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* 9, 2751–2756.
- Wang, X., Belguisse, K., Kersual, N., Kirsch, K.H., Mineva, N.D., Galtier, F., Chabos, D., and Sonenshein, G.E. (2007). Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat. Cell Biol.* 9, 470–478.

- Webb, S.E., and Miller, A.L. (2006). Ca^{2+} signaling and early embryonic patterning during the blastula and gastrula periods of zebrafish and *Xenopus* development. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1192–1208.
- Westfall, T.A., Hjertos, B., and Slusarski, D.C. (2003). Requirement for intracellular calcium modulation in zebrafish dorsal-ventral patterning. *Dev. Biol.* 259, 380–391.
- White, C., Li, C., Yang, J., Petrenko, N.B., Madesh, M., Thompson, C.B., and Foscett, J.K. (2005). The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. *Nat. Cell Biol.* 7, 1021–1028.
- Wilkins, S.J., Yoong, S., Verkade, H., Mizoguchi, T., Plowman, S.J., Hancock, J.F., Kikuchi, Y., Heath, J.K., and Perkins, A.C. (2008). Mtx2 directs zebrafish morphogenetic movements during epiboly by regulating microfilament formation. *Dev. Biol.* 314, 12–22.
- Youn, C.K., Cho, H.J., Kim, S.H., Kim, H.B., Kim, M.H., Chang, I.Y., Lee, J.S., Chung, M.H., Hahm, K.S., and You, H.J. (2005). Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity. *Nat. Cell Biol.* 7, 137–147.
- Zinkel, S., Gross, A., and Yang, E. (2006). BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ.* 13, 1351–1359.

Developmental Cell, Volume 20

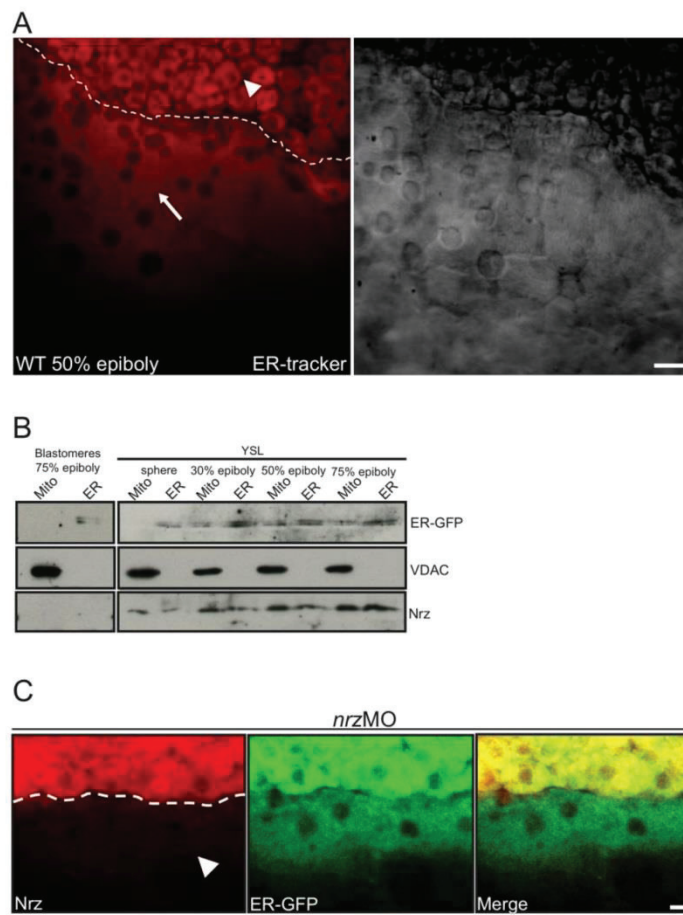
Supplemental Information

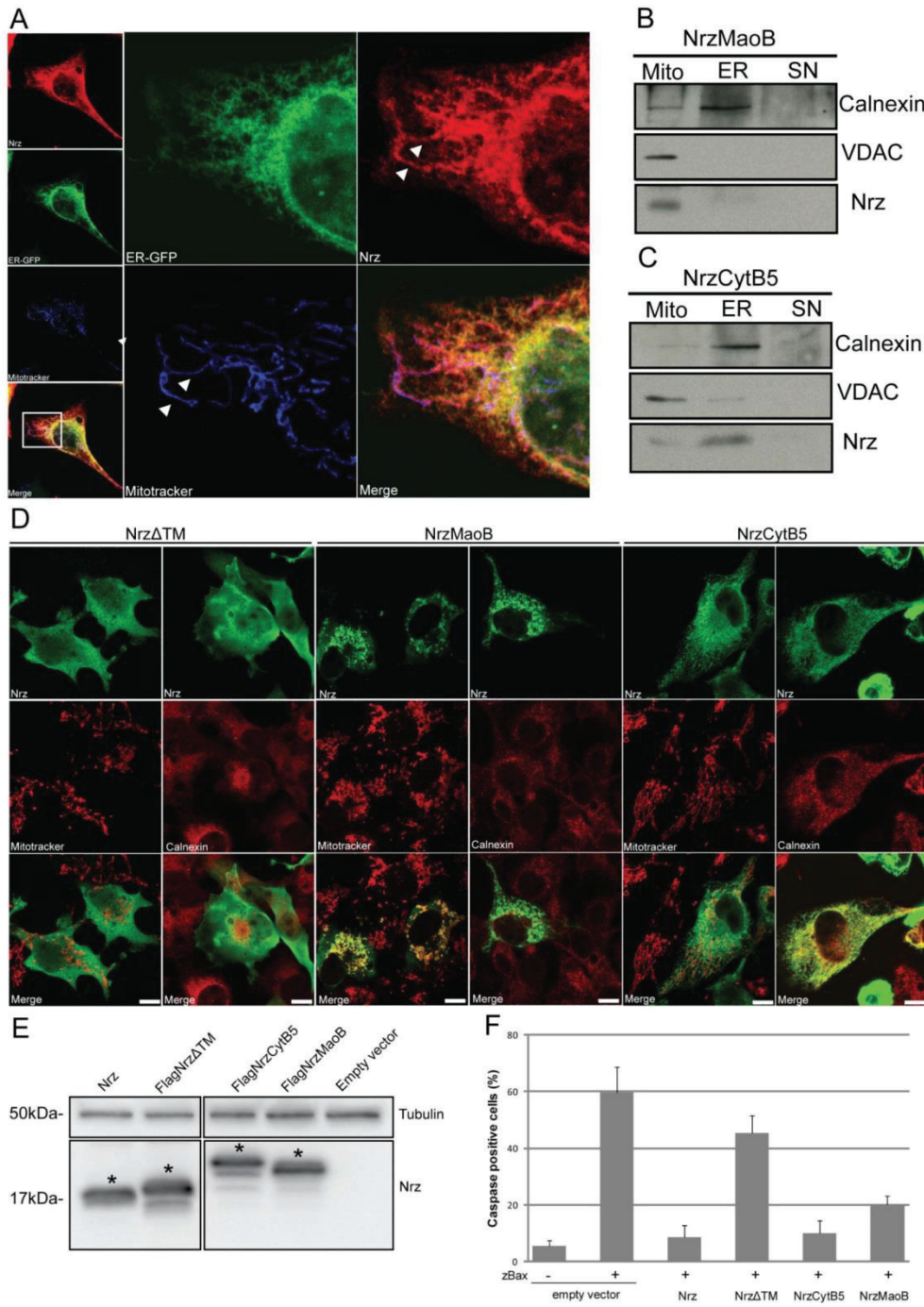
The Apoptotic Regulator Nr2 Controls

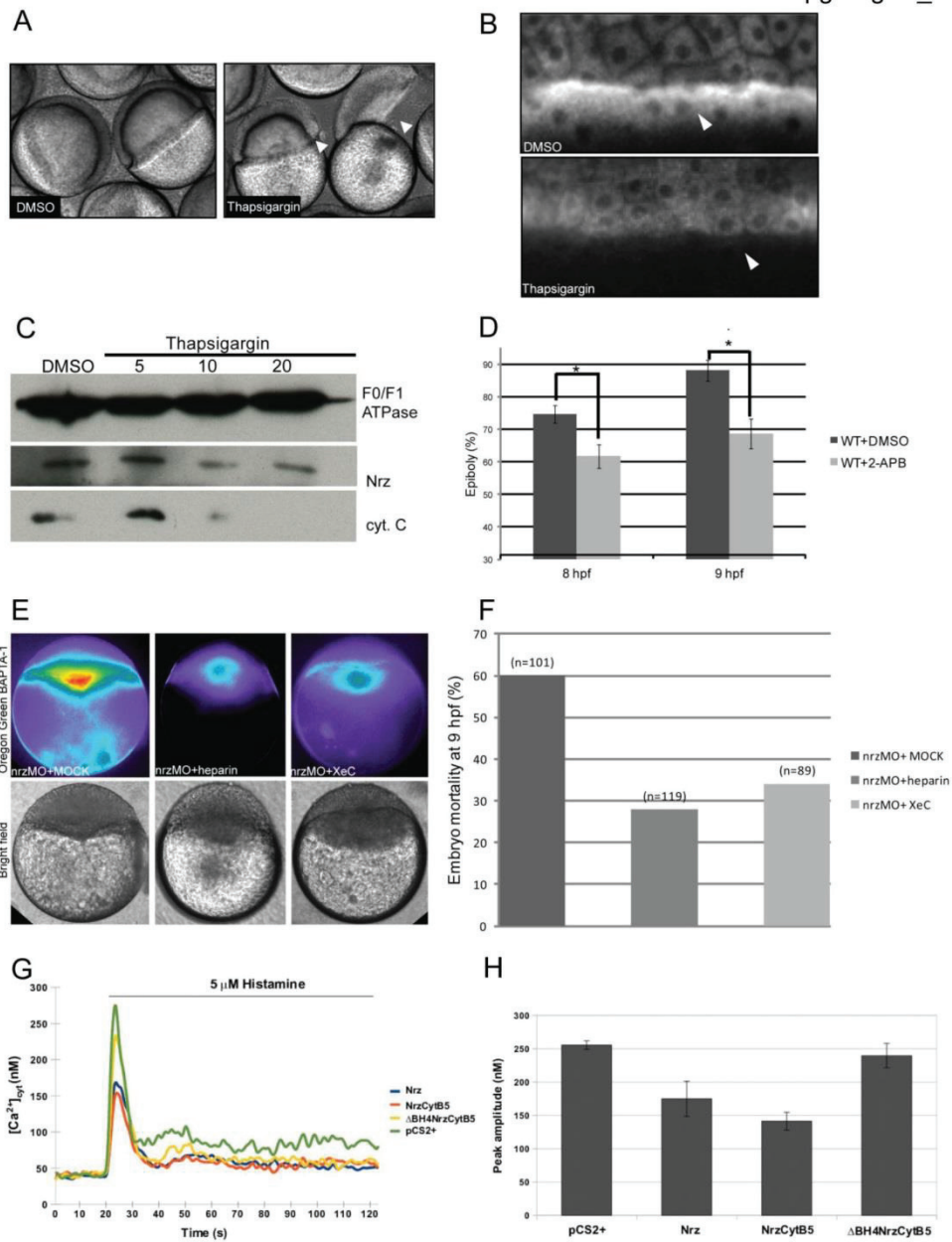
Cytoskeletal Dynamics via the Regulation

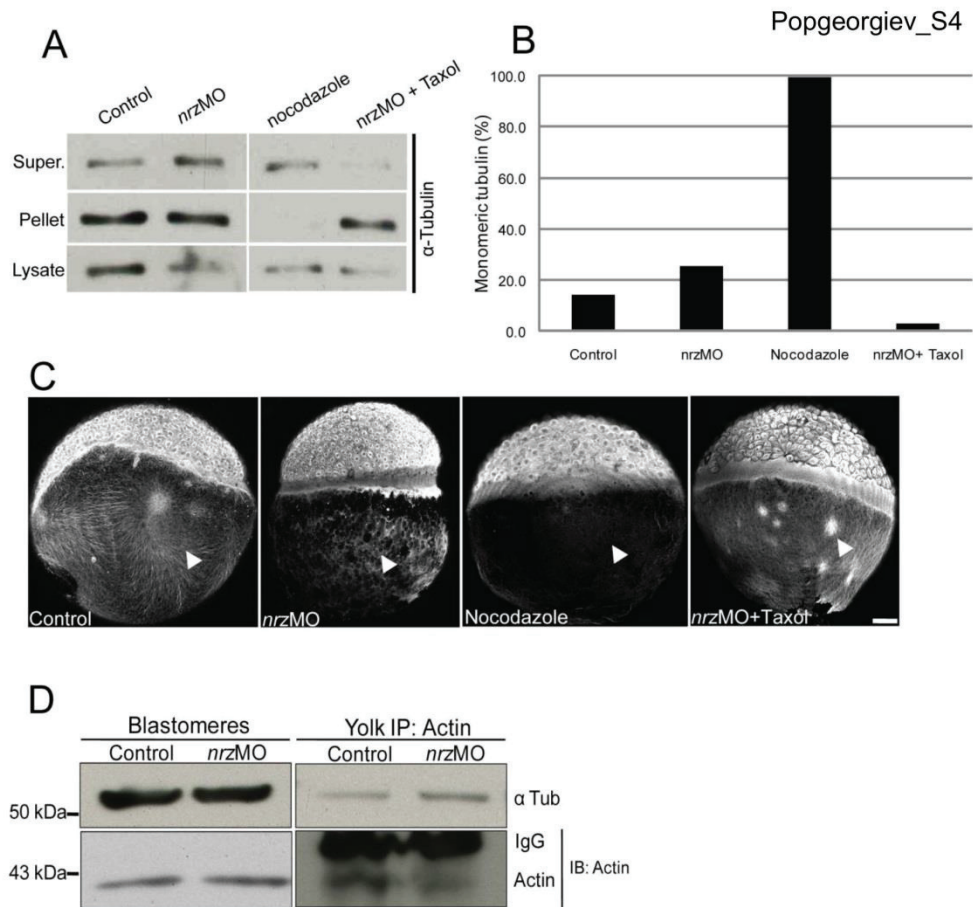
of Ca²⁺ Trafficking in the Zebrafish Blastula

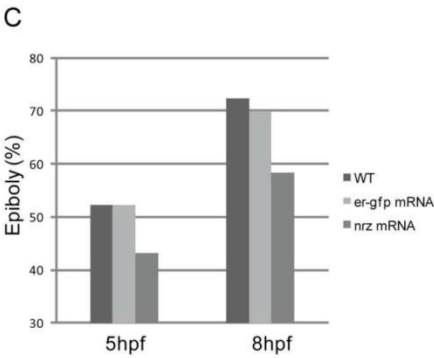
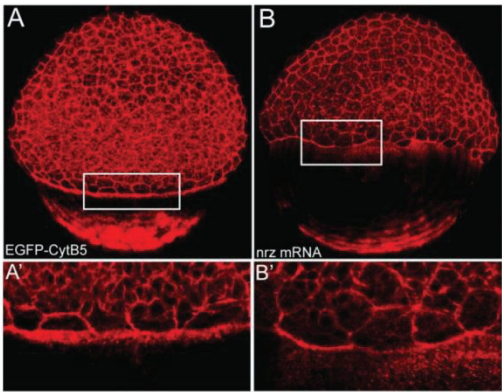
Nikolay Popgeorgiev, Benjamin Bonneau, Karine F. Ferri, Julien Prudent, Julien Thibaut, and Germain Gillet











LEGENDS TO SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1, related to Figure 1. Endoplasmic reticulum detection and Nrz localization in the yolk syncytial layer

(A) Confocal section of ER-tracker™ injected embryos at the 50% epiboly stage (left panel) in the margin region, between blastomeres (white arrowhead) and the YSL which is characterized by an intense ER-tracker™ red staining (white arrow). Unlabelled YSL nuclei appear as black dots. The corresponding bright field image is shown (right panel). (B) Subcellular fractionation of YSL mitochondria and YSL endoplasmic reticulum of ER-GFP-expressing embryos at sphere, 30%, 50% and 75% epiboly. Nrz is detected both in the ER fraction (ER) and the mitochondrial fraction (Mito). Subcellular fractionation of blastomeres at 75% epiboly shows absence of Nrz in both organelles (left lanes). VDAC and GFP antibodies were used as mitochondrial marker and ER marker respectively. (C) Confocal microscopy analysis of *nrz*MO injected embryo (*nrz* knock down). Detection of ER-GFP (green, middle panel) and endogenous Nrz protein (red, left panel) in the YSL of *nrz* knock down embryo at 50% epiboly stage. Nrz staining is absent in the YSL of *nrz* knock down embryos (white arrowhead). Scale bar: 20µm.

Supplemental Movie S1, related to Figure 2.

Time lapse imaging (6 frames/minute) of *nrz* morphants shortly after the shield stage showing typical margin constriction.

Figure S2, related to Figure 2. Subcellular localization and anti-apoptotic activity of wild type and mutant Nrz proteins

(A) Representative confocal images of HeLa cell transiently expressing ER-GFP and Nrz protein stained with anti-Nrz polyclonal antibody. Mitochondria were labeled with Mitotracker™ deep red dye. Nrz co-localizes with mitochondria (white arrowheads) and ER organelles. White rectangle represents the area observed at higher magnification (right panels). (B,C) Subcellular fractionation of HeLa cells extracts expressing NrzCytB5 or NrzMaoB mutants. Mitochondrial fraction (Mito), ER fraction (ER) and cytosolic fraction (SN) were analysed by immunoblotting with anti-Nrz antibody; VDAC and Calnexin antibodies were used as mitochondrial and ER markers respectively. (D) Representative confocal images showing subcellular localization of NrzΔTM, NrzCytB5, and NrzMaoB. Mitochondria were labeled with the Mitotracker™ fluorescent probe, ER was stained with anti-Calnexin antibody, Nrz mutants were detected with an anti-Nrz polyclonal antibody. (E) Immunoblot detection of Nrz, NrzΔTM, NrzCytB5 and NrzMaoB in HeLa cells. Alpha-Tubulin was used for calibration purpose. (F) Histogram showing the effect of Nrz mutants on zBax-induced cell death. Apoptosis was measured by counting caspase positive cells with pycnotic nuclei. NrzCytB5 and NrzMaoB both prevented caspase activation, contrary NrzΔTM.

Figure S3, related to Figure 4. Implication of calcium signaling from the ER in *nrz* morphants phenotype

(A) Thapsigargin injected embryos (5 μ M) showing margin constriction and blastomere detachment (black arrowheads, right panel), as compared to DMSO-injected controls (left panel). (B) Mitotracker™ labeling of YSL mitochondria showing the dramatic decrease of the $\Delta\Psi_m$ of thapsigargin-treated embryos, compared to control embryos. (C) Immunoblot analyses. Detection of cytochrome C in YSL mitochondria isolated from embryos treated with increasing doses of Thapsigargin (μ M) (bottom panel). The same western blot was probed with anti-Nrz (middle panel) and anti-F0/F1 ATPase (top panel, loading control) antibodies. (D) Histogram showing the effect of 2-APB treatment on epiboly progression (n : number of injected embryos); control embryos were treated with DMSO. (E) False color images of zebrafish embryos injected at 1-cell stage with *nrz*MO and Oregon Green BAPTA-1 AM, and re-injected at 512-cells stage with MOCK, heparin (400 μ g/mL) or Xestospongin C (20 μ M). (F) Embryo mortality measured at 9hpf. Number of injected embryos is shown (n). (G) Representative response of Fura-2 loaded HeLa cells either transiently expressing Nrz, NrzCytB5, Δ BH4NrzCytB5 or transfected with empty vector (pCS2+). Cells were stimulated with 5 μ M histamine, an IP3-generating agonist (Peppiatt et al., 2003) during the indicated time (horizontal bar), and the kinetics of the subsequently Ca²⁺ release was measured by fluorescence as described in supplementary materials and methods. Representative data from 3 independent experiments. (H) Quantification of the histamine-induced Ca²⁺ peak. Means of 3 independent experiments, error bars are shown.

Figure S4, related to Figure 5. Effect of *nrz* knock down on cytoskeleton organization in the YSL

(A) Immunoblot showing the content of monomeric tubulin (supernatant) and polymerized microtubules (pellet) obtained by subcellular fractionation of zebrafish embryo lysates. (B) Densitometry measurement showing the percentage of monomeric tubulin expressed as a percentage of total tubulin in each fraction. (C) Alpha tubulin staining showing the effect of *nrz* silencing on microtubule organization in the yolk cell. Control embryos exhibit a dense microtubule network in the yolk cell (white arrowheads); in *nrz* morphants this network is severely altered. Embryos treated with Nocodazole (6.5 μ M) show a similar phenotype. In contrast, incubation of *nrz* morphants with Taxol (50 μ M) restores the yolk cell microtubule network. Scale bar: 50 μ m. (D) Immunoblot analysis of the actin content in blastomeres and in the yolk cell of control embryos and *nrz* morphants. Yolk cell proteins were separated from the blastomeres and yolk cortical actin was immunoprecipitated. Lefts panels: whole protein extracts from blastomeres; right panels: immunoprecipitated cortical actin (IP) from yolk homogenates. Alpha tubulin was used for calibration..The intensity of the actin band appeared to be slightly reduced in *nrz* morphants, suggesting that some proteolytic cleavage may actually have occurred in *nrz* morphants; however this partial degradation might not account entirely for the dramatic disappearance of cortical F-actin cables in the yolk cell.

Figure S5, related to Figure 6. Effect of Nrz overexpression on epiboly progression.

(A) Confocal microscopy analysis of phalloidin labelled embryos. Nrz over-expression leads to the inhibition of F-actin ring formation. Embryos expressing ER-GFP were used as controls. (B) Histogram showing the effect of Nrz over-expression on epiboly progression : Nrz slows down epiboly, ER-GFP having no effect ; mock injected embryos (WT) are used as controls.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Morpholinos, plasmids & antibodies

PET21b-P35, pCMV-FLAG-Bcl2-CytB5 and pCMV-FLAG-Bcl2-MaoB vectors were purchased from Addgene. *Nrz* ATG morpholino (*nrz*MO) was designed according to the manufacturer's recommendations Gene Tools, LLC, with the following sequence:

5' CATTTCCTCCCAGCGATGTCAGAC and negative control *nrz* morpholino containing 4 mismatches (4mis-*nrz*MO): CATTATCCTGCCAGCCATGTGAGAC. *In vitro* mRNA transcription kit SP6 mMESSAGE mMACHINE was purchased from Ambion. Chemical reagents, anti α -tubulin mouse monoclonal DM1A (T9026) antibody, anti α -actin rabbit polyclonal antibody (A2066), were purchased from Sigma-Aldrich and fluorescent dyes from Molecular Probes (Invitrogen). Anti-activated caspase-3 antibody (no. 559565) was purchased from BD Biosciences, anti phospho MLC2 (Ser19) (no. 3675) from Cell Signaling Technology, anti-cytochrome C mouse antibody (MAB897) from R&D Systems and anti baculovirus P35 antibody (IMG-5740) from Imgenex. Anti IP3RI antibody (H-80) was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti *Nrz* rabbit polyclonal antibody was produced as previously described (Arnaud et al., 2006).

Vector constructions and mRNA in vitro transcription

Nrz and *zbax* open reading frames were cloned in the pCS2+ expression vector as previously described (Arnaud et al., 2006). Transmembrane domains of CytB5 and MaoB were cloned from pCMV-FLAG-Bcl2-CytB5 and pCMV-FLAG-Bcl2-MaoB respectively. For constructing *Nrz*CytB5, and *Nrz*MaoB mutants, the *Nrz* Δ TM open reading frame lacking the stop codon was cloned in frame with CytB5 and MaoB TM domains using the XhoI restriction site for ligation. Flag tag was added to the N-terminus to ensure the correct

immunodetection of these mutants. Mutants were inserted between the ClaI/XbaI restriction sites in the pCS2+ vector. The p35 open reading frame was cloned from the pET21b-P35 vector and then inserted in pCS2+ using the EcoRI/XbaI restriction sites. *In vitro* transcription for the different constructions was carried out using the SP6 mMESSAGE mMACHINE kit as recommended by the manufacturers. For constructing pCS2+EGFP-CytB5 *egfp* cDNA obtained from pEGFP-C1 vector (Clontech®) was cloned between ClaI/XhoI restriction sites in pCS2+ vector containing CytB5 TM domain.

Zebrafish lines and care

Zebrafish (crosses between AB and TU or AB and TL strains) were raised and maintained according to standard procedures as described in ZFIN

(http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html). Zebrafish embryos were systematically dechorionated at the one-cell stage with pronase solution (2mg/mL) for 5 minutes, washed several times with 1L of egg water (Danieau 0.3 X media : (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃)₂, and 5.0 mM HEPES pH 7.6)) and injected or grown for further manipulations.

Subcellular fractionation of transfected cells

For HeLa cells fractionation, cells at 90% confluence in 10cm plates were transfected with pCS2+-NrxCytB5 or pCS2+-NrxCaoB using Lipofectamine transfection reagent. Twenty four hours after transfection, mitochondria were purified using the Qproteome™ Mitochondria Isolation Kit (QIAGEN) according to manufacturer recommendation. After mitochondria isolation, the ER was purified from the supernatant as described above.

Primers

Flag-Nrz Δ TMstop

5'ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCCTGTTGGTTGA
GGGAAC

5'ATATCTCGAGCTATGTTTTTCATGGAGGACTCCTGGTTCA

Flag-Nrz Δ TM

5'ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCC
TGTTGGTTGAGGGAAC

5'ATATCTCGAGTGTTCATGGAGGACTCCTGGTTCA

CytB5TM

5'ATATCTCGAGATCACTACTATTGATTCTAGTTCCAGTTGG

5'ATATTCTAGATCAGTCCTCTGCCATGTATAGGCGATA

MaoBTM

5'ATATCTCGAGCTGCTCAGGCTGATTGGATTGA

5'ATATTCTAGATTAGACTCTCACAAGTAGCCCCC

P35

5'ATATGAATTCATGTGTGTAATTTTCCGGTAGAAATC

5'ATATTCTAGATTATTTAATTGTGTTTAATATTACATTTTGTG

EGFPCYTB5

5' ATATATCGATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC

5' ATATCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGA

FlagBH4

5' ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCCTGTTGGTTGA
GGGAAC

5' ATATCTCGAGCTACGCCGACTCGCTGGGAGGCGTCTG

FlagΔBH4Nr2

5' ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCAACAGACGCCTCCCA
GCGAGT

5' ATATCTCGAGTCAGCGTACTAAGAGGAAGGTTAGAC

Transmission electron microscopy

For transmission electron microscopy, embryos were fixed in 100 mM cacodylate buffer containing 1.5% glutaraldehyde, 1% paraformaldehyde, pH 7.4 for 24 hours at room temperature. Embryos were then washed in 100 mM cacodylate buffer containing 8% sucrose for 45 minutes. Embryos were subsequently washed in distilled water, dehydrated in a graded ethanol series and treated for 10 minutes with propylene oxide, one hour by Epon/propylene oxide and incubated overnight in Epon 812. The following day, Epon was changed and embryos were embedded in molds and oriented. Ultrathin sections (70 nm thick) were cut with an ultramicrotome and contrasted with uranyl acetate (1 hour, 56°C) and lead citrate (4 min, 20°C). Grids were observed in a *Philips CM120* operating at 80 kV.

Subcellular localization of Nrz

Colocalization study of Nrz protein was carried out in HeLa cells transiently expressing Nrz protein. Twenty four hours after transfection, cells were fixed in paraformaldehyde 4% for 20 min and washed three times in PBS. For ER and mitochondrial colocalization test, cells were expressing ER-GFP and were labeled with 100nM Mitotracker™ Deep Red for 20 min prior fixation. Cells were then permeabilized for 20 min with PBS, 2% BSA, 0.1% Triton X-100 and then incubated with 1/100 anti-Nrz antibody for 1 hour at room temperature. Cells were then washed 3 times with PBS + 0.1 % Triton X-100, and subsequently incubated with Alexa Fluor secondary antibody. Finally, cells were mounted on a cover slip and analyzed using confocal microscopy. Colocalization study of Nrz mutants was carried out in Cos-7 cells as described above except that ER was marked with the anti-calnexin antibody (1/200) and mitochondria were labeled with Mitotracker™ Red CMXRos.

Intracellular calcium measurements

Measurement of cytosolic calcium in HeLa cells was performed by monitoring Fura-2 fluorescence of cells cultured in 96-wells plate using a Mithras LB 940 multimode microplate reader (Berthold Technologies).

Cells were loaded with 2 mM Fura-2 acetoxymethyl ester in a balanced salt solution (BBS) (NaCl, 121mM; KCl, 5.4mM; MgCl₂, 0.8mM; CaCl₂, 1.8mM; NaHCO₃, 6mM; D-glucose, 5.5mM; HEPES, 25mM; pH 7.3) for 30 min at 37°C. Following Fura-2 loading, cells were incubated a further 30 min in fresh Ca²⁺-free BBS at room temperature for de-esterification.

Fluorescence values were obtained by alternate excitation at 340 and 380 nm. Emission signal was collected at 510 nm every 200 ms. Histamine in Ca²⁺-free BBS was injected in each well after 20 sec of measurement.

Cytosolic Ca^{2+} concentration was calculated by inserting the fluorescent values into the following equation:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times Q (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

R represents the fluorescence intensity ratio $F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$. R_{\min} and R_{\max} were obtained by equilibrating cells with solutions containing zero Ca^{2+} (10 mM EGTA, 10 μM ionomycin; Sigma) and then saturating Ca^{2+} (10 mM CaCl_2 , 10 μM ionomycin). Q is the ratio of F_{\min} to F_{\max} at 380 nm. The K_d was taken to be 220 nM.

Mutants activity on zBax induced cell death

To test the anti-apoptotic activity of Nrz mutants, HeLa cells were transiently co-transfected with pCS2+zBax alone or in combination with expression vector for wt or mutant Nrz. Twenty four hours later, active caspase positive cells were labeled with FLICA detection kit (ImmunoChemistry Technologies_{LLC}) following manufacturer's instructions. Pycnotic nuclei were labeled using Hoechst 33342 dye.

Analysis of microtubules and free tubulin in zebrafish embryos.

For microtubule staining, embryos injected with *nrz*MO and/or treated with Nocodazole (6.5 μM) or Taxol (50 μM) were fixed at 28.5 °C in (80 mM KPipes, pH 6.8; 5mM EGTA; 1mM MgCl_2) containing 3.7% formaldehyde, 0.25% glutaraldehyde; 0.5 μM Taxol; 0.2% TX-100 for 4 hours, washed extensively in PBS, then twice in TBSN (TBS + 0.1% NP-40) and incubated overnight with primary 1/500 α -tubulin at 4 °C, in TBSN+ 2% BSA. Embryos were washed once in TBSN for 5 min followed by 3 washes for 30 min and then incubated overnight with FITC conjugated secondary antibody (1/200). Embryos were then washed in TBSN and mounted with 1:1 TBS:Glycerol in Falcon chambers precoated with TBS + 2% BSA.

Quantitative analysis of microtubule and free tubulin was carried out as previously described (Davis et al., 2005). Briefly, to isolate the free and polymerized tubulin fractions, all of the assay components (*e.g.* samples, rotors, centrifuge tubes, and buffers) were maintained at 28.5 °C throughout the isolation procedure. Control and *nrz*MO injected embryos were lysed in cell lysis microtubule stabilization buffer (100 mM Pipes, pH 6.9; 5mM MgCl₂; 1mM EGTA, 30% glycerol, 0.1% nonidet P-40, 0.1% Triton X-100, 0.1 % Tween 20, 0.1 % β-mercaptoethanol, 1mM dithiothreitol, 1mM GTP, 10mM ATP, 10μM Taxol, 0.001 % antifoam). Cell homogenization and centrifugation was done at 28.5 °C to maintain microtubule stability. After centrifugation at 100,000g for 30 minutes, supernatants containing soluble tubulin were separated from the pellets containing microtubules (polymerized tubulin plus microtubule associated proteins). The microtubule pellet was resuspended in 50 μL of 200 mM CaCl₂ containing protease inhibitor on ice with frequent vortexing for one hour. For Western blot analysis, 6 μg of total lysate, supernatant and pellet samples were separated on 8% acrylamide gels. For immunodetection an anti alpha tubulin antibody was used (1/200 dilution).

Epiboly progression analysis

Embryos were either injected with *nrz* or *er-egfp* mRNAs at one cell stage, or incubated with 2-APB at oblong-sphere stage. Images of embryos between 5 and 9 hpf were acquired using a *Nikon TE30* inverted microscope and Metamorph Software. Epiboly was quantified using Image J software by measuring distance of the margin of the blastoderm from the animal pole (D) and by measuring the size of the embryos (S). Epiboly progression was obtained by the ration D/S.

Heparin and Xestospongin C injection

Heparin at 400 μg/mL or Xestospongin C at 20 μM were injected at 512-cells stage after injection of *nrz*MO at 1 cell-stage. To confirm the ability of heparin and Xestospongin C to

efficiently inhibits IP3R, embryos were injected at one cell stage with Oregon Green BAPTA-1 AM.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

Davis, F.J., Pillai, J.B., Gupta, M., and Gupta, M.P. (2005). Concurrent opposite effects of trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, on expression of alpha-MHC and cardiac tubulins: implication for gain in cardiac muscle contractility. *American Journal of Physiology* 288, H1477-1490.

Peppiatt, C.M., Collins, T.J., Mackenzie, L., Conway, S.J., Holmes, A.B., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Seo, J.T., and Roderick, H.L. (2003). 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium* 34, 97-108

Article n°2

The anti-apoptotic protein Nrz inhibits IP₃ binding to IP₃R1 to control Ca²⁺ signaling and actin dynamics during zebrafish epiboly

Bonneau B, Nougarede A, Prudent J, Peyri  ras N, Rimokh R, Gillet G

Science Signaling, soumis

2 RÉSUMÉ ARTICLE N°2

Dans cette seconde étude, nous nous sommes intéressés au mécanisme de régulation de l'IP₃R par Nrz ainsi qu'à la contribution de l'interaction entre ces deux protéines dans l'épibolie. Dans un premier temps nous avons caractérisé les domaines de Nrz impliqués dans la régulation du canal calcique afin de mieux comprendre son mode d'action. En effet, alors que le domaine BH4 de Bcl-2 est suffisant pour réduire la sortie de calcium par l'IP₃R celui de Bcl-xL n'a aucun effet sur l'activité du canal (Monaco et al., 2012b). Ici, nous avons démontré que le domaine BH4 de Nrz n'est pas suffisant pour exercer un effet répresseur sur la sortie de calcium du RE. Les domaines BH4, BH3 et BH1 sont en fait requis pour l'activité de Nrz au RE. De façon intéressante un mutant de Nrz ne contenant que ces domaines est bien capable de diminuer la quantité de calcium relargué par l'IP₃R mais il perd en revanche sa capacité à inhiber l'apoptose induite par Bax suggérant que ces deux fonctions de Nrz sont distinctes. De plus, nous avons montré que contrairement aux autres membres de la famille Bcl-2, Nrz interagit avec le domaine de liaison de l'IP₃ et semble exercer son activité sur le récepteur en diminuant la fixation du ligand. Nous avons pu identifier un résidu dans le domaine de liaison essentiel pour l'interaction avec Nrz et le domaine BH4 de Nrz possède un résidu cystéine conservé parmi ses orthologues qui pourrait expliquer ce profil d'interaction. Par la suite nous nous sommes interrogés sur une possible régulation de l'interaction Nrz/IP₃R. En effet, des vagues de calcium étant générées dans le YSL au cours de l'épibolie nous avons émis l'hypothèse qu'une modulation de l'interaction entre ces deux protéines pourrait participer à la formation de ces vagues. De façon intéressante, nous avons montré que Nrz est phosphorylé au début de l'épibolie. Par analogie avec Bcl-2, nous avons identifié trois sites potentiels de phosphorylation dans la boucle non structurée entre les domaines BH4 et BH3 de Nrz. La mutation de ces résidus révèle qu'une forme phospho-mimétique de Nrz perd sa capacité à interagir avec l'IP₃R. Ces résultats suggèrent donc qu'au cours de l'épibolie Nrz pourrait être phosphorylé afin de permettre la génération de vagues de calcium dans le YSL. Nous avons donc étudié l'impact de la phosphorylation de Nrz sur la signalisation calcique lors de l'épibolie. Nous avons observé dans des embryons contrôles ou exprimant la forme sauvage de Nrz, au début de l'épibolie l'apparition de vagues cycliques de calcium dans l'e-YSL. De façon remarquable, l'expression d'une forme non-phosphorylable de Nrz (NrzAAA) abolit la formation des vagues de calcium dans l'embryon. L'expression de NrzAAA s'accompagne par ailleurs d'un retard d'épibolie pouvant entraîner la mort précoce des

embryons. Ce phénotype sévère se traduit par un détachement des blastomères et du vitellus. À l'inverse de l'invalidation de *nrz*, où ce détachement est provoqué par une constriction de la marge, ce phénotype semble plutôt provenir d'un « relâchement » de la marge. Nous avons par ailleurs pu montrer que dans les embryons exprimant la forme non-phosphorylable de Nrz la formation de l'anneau d'actine à la marge de l'EVL est perturbée. Ainsi, nos résultats suggèrent que lors des premières étapes de l'épibolie, la phosphorylation de Nrz pourrait être requise pour permettre la génération de vagues de calcium participant au recrutement de l'actine à la marge de l'EVL afin d'assurer la formation de l'anneau d'actine-myosine nécessaire aux mouvements d'épibolie.

Title: The anti-apoptotic protein Nrz inhibits IP₃ binding to IP₃R1 to control Ca²⁺ signaling and actin dynamics during zebrafish epiboly

Authors: Benjamin BONNEAU¹, Adrien NOUGAREDE¹, Julien PRUDENT¹, Nadine PEYRIERAS², Ruth RIMOKH¹, Germain GILLET^{1,*}

One Sentence Summary: Nrz regulates Ca²⁺ signaling by decreasing IP₃ fixation on IP₃R which contributes to generate calcium waves required for epiboly in zebrafish embryos

Affiliations:

¹ Université de Lyon, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, U1052 INSERM, UMR CNRS 5286 CNRS, Université Lyon I, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec 69008 Lyon, France

² Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS UPR 3294, Av. de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

*Corresponding author: germain.gillet@univ-lyon1.fr; Tel.: +33469166656; Fax: +33469166660.

Abstract: Members of the Bcl-2 family are key regulators of outer mitochondrial membrane permeabilization. However, they can also localize at the endoplasmic reticulum, where they control calcium homeostasis by interacting with Ca²⁺ channel such as inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP₃R). In this study, we characterized the molecular mechanism underlying the control of IP₃R1 permeability by the zebrafish Bcl-2 homolog Nrz. We show for the first time that a Bcl-2 family member can interfere with the binding of IP₃ on its receptor by interacting with the domain involved in ligand fixation. Moreover, we demonstrate that Nrz phosphorylation abrogates its interaction with IP₃R1. This post-translational modification of Nrz enables the generation of cyclic calcium transients during the first phase of epiboly, which induces actin polymerization. Thus, beyond their role in apoptosis, Bcl-2 family members appear to participate in other major cellular processes, such as cytoskeleton remodeling, by tightly regulating calcium signaling.

Introduction

The Bcl-2 family proteins are among the main regulators of apoptosis. They control outer mitochondrial membrane permeabilization, which leads to caspase activation and subsequent death (1). In addition to their role in mitochondria, Bcl-2 proteins are found at the endoplasmic reticulum (ER), where they participate in Ca^{2+} homeostasis regulation. In particular, some of the anti-apoptotic subgroup members of the Bcl-2 family have been shown to interact with the ER-resident Ca^{2+} channel, the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor (IP3R). IP3R is activated upon the binding of its ligand, IP3, resulting in an increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration via a mechanism called IP3-induced Ca^{2+} release (IICR). IP3R is composed of five domains (2). The suppressor domain (SD) and the IP3-binding domain (IP3BD) are implicated in the binding of the ligand. The central modulatory and transducing domain (MTD) binds several molecules that regulate IP3R activity but is also involved in signal transduction from the ligand-binding domain to the channel-forming domain (CFD). Finally, the coupling domain (CD) is implicated in IP3R tetramerization. Bcl-2 family proteins have been shown to interact with either the MTD or the CD, with different regulatory mechanisms and effects on IICR (3).

Ca^{2+} release through IP3R mediates numerous cellular and physiological processes, such as cell proliferation, differentiation, apoptosis, fertilization, and embryonic development (4). In particular, in the zebrafish embryo, Ca^{2+} signaling plays a key role in the early stages of embryonic development (5). During this period, the blastomeres that are in contact with the yolk release their content in the yolk cell, forming the yolk syncytial layer (YSL). At this stage, the embryo comprises the YSL, enveloping layer (EVL), and deep cell layer (DCL). Prior to gastrulation, the blastomeres begin to migrate from the animal pole to the vegetal pole in a process known as epiboly. In the YSL, IP3R-dependent Ca^{2+} signaling occurs at the onset of epiboly (6) and again once the EVL has passed the equator of the embryo (7). This latter Ca^{2+} signal is likely correlated with the contraction of an actin-myosin ring at the EVL margin which is required for proper epiboly progression (8).

We recently demonstrated that the anti-apoptotic protein Nrz (the zebrafish ortholog of Nrh/Bcl2l10) plays a crucial role in epiboly progression (9). Nrz function during epiboly relies on its ER localization in the YSL, where it interacts with IP3R1 and decreases IICR. Thus, during epiboly, nrz inactivation induces a dramatic Ca^{2+} increase at the blastoderm margin, which leads to premature contraction of the actin-myosin ring via activation of the Calmodulin/MLCK (Myosin Light Chain Kinase) pathway (10).

In the present study, we investigated the role of Nrz in the generation of the Ca²⁺ waves observed in the YSL during epiboly. We describe the mechanism by which Nrz regulates IICR and demonstrate, for the first time, that a member of the Bcl-2 family can interact with the IP₃-binding domain of IP₃R1 and disrupt the binding between IP₃ and its receptor. We further demonstrate that this interaction is regulated by Nrz phosphorylation, which is required for the generation of Ca²⁺ waves and the formation of the actin ring during epiboly.

Results

The BH4-BH1 region of Nrz is required to regulate IP₃-induced Ca²⁺ release

We previously demonstrated that Nrz interacts with IP₃R1 via its N-terminal Bcl-2 homology (BH)4 domain (10). Other members of the Bcl-2 family have also been reported to interact with IP₃R via their BH4 domains. However, while the BH4 domain of Bcl-2 is sufficient to exert an inhibitory effect on IICR, the BH4 domain of Bcl-xL is not (11). To study the effect of the BH4 domain of Nrz on IICR, we fused the BH4 domain with the ER-targeting sequence of cytochrome b5 (NrzBH4Cb5) (Figure 1A). Coimmunoprecipitation experiments demonstrated that the BH4 domain alone was sufficient to interact with IP₃R1 (Figure 1B). We then focused on the functional effect of the BH4 domain *in vivo* by examining its ability to prevent the phenotype induced by the injection of an antisense morpholino against *nrz* (*nrz*MO) (Figure 1C). In contrast to the full-length protein, NrzBH4Cb5 was not able to prevent the phenotype induced by *nrz* inactivation (Figure 1D), suggesting that the BH4 domain of Nrz alone cannot reduce IICR. This was confirmed in HeLa cells, in which the expression of NrzBH4Cb5 had no effect on Ca²⁺ release induced by histamine, in contrast to NrzCb5 (Figure 1E & F).

Because the BH4 domain was not sufficient to decrease IICR, we sought to identify the region of Nrz involved in this function by generating a series of C-terminal deletion mutants. Each mutant was designed to contain the BH4 domain, which is required for the interaction with IP₃R1, and a number of α -helices (Figure 1A). The BH1 domain appears to be crucial for IICR regulation because all the mutants containing this domain efficiently prevented the phenotype induced by *nrz*MO injection (Figure 1G). By contrast, Nrz1-67Cb5, which lacks the BH1 domain, did not counteract the effect of *nrz*MO (Figure 1G). To confirm the role of the BH1 domain in IICR regulation, we tested the ability of Nrz1-67Cb5 and Nrz1-94Cb5 to decrease ER Ca²⁺ release in HeLa cells. The latter significantly reduced IICR, whereas Nrz1-67Cb5 had no effect (Figure 1H & I), indicating that the BH1 domain is required for the effect of Nrz on Ca²⁺ fluxes at the ER. These results also suggest that the role

of Nrz in ER Ca^{2+} signaling may be distinct from its anti-apoptotic function. Indeed, Nrz1-94 does not contain the hydrophobic cleft required for the interaction with pro-apoptotic members. Thus, it was unable to interact with Bax (Figure S1A) and failed to prevent caspase activation following Bax overexpression, as shown by PARP cleavage (Figure S1B). Similarly, the mutation of a glycine residue in the BH1 domain is known to abolish the interaction of Bcl-2 with Bax (12). This mutation in Nrz efficiently abrogated the interaction with Bax (Figure S1A) and the anti-apoptotic effect of Nrz (Figure S1B) without affecting its function on IICR (Figure S1C & D). Thus, Nrz appears to regulate Ca^{2+} release from the ER independently from its interaction with Bax and its anti-apoptotic function.

Nrz interacts with the IP_3 -binding domain of $\text{zIP}_3\text{R1}$ and reduces IP_3 binding with its receptor

Several anti-apoptotic Bcl-2 family proteins have been reported to interact with IP_3R , but no consensus exists regarding their binding site. We cloned all of the cytosolic domains of zebrafish $\text{IP}_3\text{R1}$ ($\text{zIP}_3\text{R1}$) to further identify the domain with which Nrz interacts (Figure 2A). Surprisingly, immunoprecipitation of the $\text{zIP}_3\text{R1}$ domains revealed that Nrz appears to interact with IP_3BD of $\text{zIP}_3\text{R1}$ (Figure 2B). To confirm this result, we performed immunoprecipitation analysis of Nrz. The interaction between Nrz and IP_3BD was also detected in this experiment, while the Nrz protein BH4 domain deletion mutant ($\text{Nrz}\Delta\text{BH4}$) was unable to interact with IP_3BD (Figure 2C). As we previously demonstrated that $\text{Nrz}\Delta\text{BH4}$ is unable to interact with $\text{IP}_3\text{R1}$, this result strongly suggests that the interaction between Nrz and IP_3BD is specific.

Because Nrz interacts with IP_3BD , it is very likely that it could modify the binding of the ligand on $\text{IP}_3\text{R1}$. To test this hypothesis, we used the IRIS (IP_3R -based IP_3 sensor) construct, which contains the IP_3BD flanked by the fluorescent proteins Venus and ECFP. Because IP_3 binding induces a conformational change in IP_3BD , the fluorescent resonance energy transfer (FRET) between ECFP and Venus is decreased upon IP_3 binding to IP_3BD (13). Because IRIS is cytosolic (13), we deleted the transmembrane domains of all forms of Nrz that were used to ensure the interaction between the two proteins. The cells were stimulated with 5 μM histamine, and the ratio of ECFP and Venus fluorescence was calculated. Interestingly, Nrz and Nrz1-94 significantly decreased the change in the FRET signal that was induced by histamine treatment. By contrast, the Nrz BH4 domain deletion mutant and the BH4 domain alone had no effect (Figure 2D and E). These results strongly suggest that Nrz exerts its activity on $\text{IP}_3\text{R1}$ by decreasing the binding of IP_3 to its receptor.

A series of point mutations in IP₃BD of the mouse IP₃R1 isoform have been reported to abolish the binding of not only IP₃ but also IRBIT (IP₃R binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate), which is the only protein known to bind to IP₃BD (14,15). Because all of these residues are conserved in zIP₃R1, we generated mutants of IP₃BD to determine whether Nrz shares the same binding site as IP₃. Surprisingly, all of the mutants retained the ability to interact with Nrz (Figure 2F), suggesting that Nrz does not act as IRBIT by competing with IP₃ for its binding site (15).

To further investigate the effect of Nrz on IP₃ binding, we performed a docking experiment between IP₃BD and the BH4 domain of Nrz (Figure 2G). An analysis of the docking solutions permitted the identification of three residues within IP₃BD that could be involved in the interaction with Nrz: Glu255, Glu410, and Tyr576. We then mutated these amino acids. The Glu255 residue appears to be involved in the interaction with Nrz because its mutation to alanine strongly decreased the interaction (Figure 2H). The docking model suggested that the interaction with Glu255 depends on the Cys20 residue of Nrz. Remarkably, this residue is highly conserved in Nrz orthologs (Figure S2), suggesting that this interaction with IP₃BD could be a common feature of these proteins.

Nrz phosphorylation modifies its interaction with IP₃R1

During epiboly, IP₃R-dependent Ca²⁺ waves occur in a cyclic manner in the YSL (6), where Nrz is expressed. However, during this developmental stage, the amount of Nrz increases constantly without any cyclic variation (10). Therefore, given the action of Nrz on IP₃R, it is likely that Nrz activity needs to be regulated to permit the generation of these Ca²⁺ waves. The phosphorylation of Bcl-2 on one threonine and two serine residues in the loop between its BH4 and BH3 domains has been shown to regulate Ca²⁺ release from the ER (16). We investigated whether such phosphorylation occurs on Nrz and whether its phosphorylation could also affect its activity at the ER.

As shown in Figure 3A, Nrz is phosphorylated on serine residues *in vivo* as soon as 30% epiboly is reached. Interestingly, Nrz harbors one threonine (T26) and two serine (S29 and S31) residues in the loop between its BH4 and BH3 domains. We then generated phosphomimetic (NrzDDD) and non-phosphorylatable (NrzAAA) mutants of Nrz by mutating these residues to aspartate and alanine, respectively. Interestingly, we observed that NrzDDDCb5 completely lost its ability to protect the embryo from *nrz* inactivation, whereas the non-phosphorylatable mutant NrzAAACb5 retained this function (Figure 3B). Similarly, in HeLa cells, NrzDDDCb5 did not reduce IICR compared to the control, whereas

NrzAAACb5 significantly decreased ER Ca^{2+} release (Figure 3C & D). These results suggest that Nrz phosphorylation could modify its activity at the ER.

To further understand how the phosphorylation of Nrz regulates its activity at the ER, we investigated whether this modification affects the Nrz/IP₃R1 interaction. Remarkably, NrzDDD lost its ability to interact with IP₃BD, while NrzAAA remained bound to IP₃BD (Figure 3E), which explains the activity loss of the phosphomimetic mutant. Finally, we generated single and double mutants to identify the residues that are critical for this regulation. Ser31 appears to be a key residue because its mutation to aspartate greatly reduced the interaction with IP₃BD, while other single mutations did not have an effect on the interaction (Figure 3F). Interestingly, mutation of serine 29 and 31 completely disrupted the interaction with IP₃BD, suggesting that Nrz could be phosphorylated on these two residues to modulate its interaction with IP₃R1.

Phosphorylation of Nrz is implicated in Ca^{2+} signaling during epiboly

Because Nrz is phosphorylated in zebrafish embryos, we studied the significance of this modification *in vivo*. At the onset of epiboly, Ca^{2+} waves are generated in the external YSL (6). This developmental stage corresponds to the phosphorylation of Nrz; therefore, we investigated whether Nrz phosphorylation plays a role in the generation of Ca^{2+} waves. Embryos were injected at the 128-cells stage with the Ca^{2+} reporting dye, CalciumGreen-1 Dextran, to observe Ca^{2+} signaling, specifically in the YSL (Figure 4A). From 30% epiboly, we observed that in wild type embryos, cyclic Ca^{2+} transients occurred within a period of approximately 8 min (Figure 4A & B and Movie S1). Remarkably, the re-expression of Nrz at the ER (NrzCb5) did not modify the frequency of these Ca^{2+} transients, although the amplitude was slightly reduced (Figure 4A & B and Movie S2). However, the re-expression of the non-phosphorylatable form of Nrz (NrzAAACb5) abolished cyclic Ca^{2+} transients in the YSL, although few $[\text{Ca}^{2+}]$ variations remained visible (Figure 4A & B and Movie S3). Taken together, these results indicate a role of Nrz phosphorylation in the generation of Ca^{2+} waves at the beginning of epiboly.

The inhibition of Ca^{2+} transients by NrzAAACb5 caused a loosening of the blastomeres from the yolk between 30 and 50% epiboly, inducing embryonic death due to cell detachment in the most severe case (Figure 4C). However, only 20% of the embryos with this phenotype died (Figure 4D), while the other embryos underwent epiboly, although the process was significantly delayed (Figure 4E). During gastrulation, an actin-myosin ring forms at the margin of the EVL between 30-40% epiboly, and this ring is required for EVL epiboly

progression (8). Given the phenotype that was observed in the embryos, we examined the status of the actin ring. Interestingly, in embryos expressing NrzAAACb5, the actin ring was significantly reduced compared to embryos expressing NrzCb5 (Figure 4F), suggesting that by controlling Ca^{2+} waves, Nrz could act on actin ring formation at the beginning of epiboly.

Discussion

Our results reveal a new regulatory mechanism of IP_3R . Thus far, two mechanisms of action have been described for the regulation of IP_3R -dependent Ca^{2+} signaling by Bcl-2 proteins. In one study, Bcl-2 was shown to inhibit apoptosis by reducing Ca^{2+} release via an interaction with the MTD (17). In another study, Bcl-xL was proposed to promote cell survival by sensitizing IP_3R to low IP_3 concentrations via an interaction with the CD (18). These differential activities of Bcl-2 proteins on IP_3R appear to be determined by key residues in their BH4 domains, which could be involved in their interactions with the receptor (19). Interestingly, human and mouse Nrz orthologs, in which Cys20 is conserved, are highly expressed in oocytes (20,21). Ca^{2+} oscillations naturally occur during oocyte maturation, and at fertilization, spermatozoid entry induces Ca^{2+} oscillations due to IP_3R opening (22). Nrz orthologs could then be regulated during these processes by a mechanism similar to the one observed during zebrafish gastrulation to allow the generation of Ca^{2+} oscillation in oocytes. Thus, the interaction with IP_3BD could permit a finer tuning of Ca^{2+} signals, which could be important for the regulation of processes that are distinct from apoptosis.

Moreover, although Nrz interacts with IP_3BD , it does not appear to act in the same manner as IRBIT, which is the only protein that has been reported to bind to IP_3BD . The fact that Nrz required at least its BH4 - BH1 domains to regulate IICR suggests two hypotheses regarding its mechanism of action. The first hypothesis is that Nrz could create a hindrance that modifies the accessibility of IP_3 to its binding site. The second hypothesis is that Nrz could perturb the conformational change in IP_3BD . This could be mediated by an interaction of the BH1 domain of Nrz with IP_3R , thus stabilizing the conformational state of IP_3BD . However, the inability of the Nrz BH4 domain deletion mutant to interact with IP_3BD or IP_3R (10) indicates that this second hypothesis is likely false.

Nrz phosphorylation is likely essential for Ca^{2+} wave generation at the beginning of epiboly, and based on our results, we hypothesize that these Ca^{2+} signals participate in actin ring formation. Indeed, Ca^{2+} oscillations occur between 30 and 50% of epiboly, which corresponds to the time when the actin-myosin ring is formed (8,23). Moreover, during myofibrillogenesis, actin and myosin assembly are regulated by Ca^{2+} transients of several

minutes in duration (24,25). Because the actin at the margin of the EVL is associated with myosin-II (26), it can be speculated that the cyclic Ca^{2+} waves occurring with an 8 min frequency in the YSL could induce actin polymerization and myosin assembly at the margin of the EVL. We can also assume that in the most severe phenotype, NrzAAA could reduce Ca^{2+} signaling in the YSL, resulting in the absence of the actin-myosin ring and rendering the embryos unable to perform epiboly.

Our results therefore emphasize the crucial role of Bcl-2 family proteins in non-apoptotic functions and suggest that during embryonic development the primary function of Bcl-2 proteins may be the control of calcium homeostasis rather than apoptosis regulation. Consistently, we recently demonstrated that Bcl-wav, a newly characterized Bcl-2 family member, is essential for convergence and extension movement during zebrafish gastrulation, in which it regulates actin protrusion formation via its role in mitochondrial Ca^{2+} uptake (27). Taken together, these studies highlight the key role of Bcl-2 proteins as Ca^{2+} homeostasis regulators in numerous cellular processes, changing the paradigm of Bcl-2 family's action range.

Materials and Methods

Intracellular calcium measurements.

HeLa cells cultured in NuncTM LabTek® chambered coverglass were incubated with 5 μM FluoForteTM in a Ca^{2+} -free balanced salt solution (BBS) for 1 h at 37°C. Fluorescence values were collected using a Zeiss LSM 780 confocal microscope. After 10 s of measurement, 5 μM histamine in Ca^{2+} -free BBS was injected.

IRIS FRET measurement.

HeLa cells cultured in NuncTM LabTek® chambered coverglass were co-transfected with pcDNA3.1-IRIS and pCS2+ encoding the different Nrz mutants (n_{mole} ratio = 1:3). Before imaging, the medium was replaced with a balanced salt solution (BBS). FRET was measured with a Zeiss LSM 780 confocal microscope by excitation at 405 nm. ECFP and Venus fluorescence were detected at 450-510 nm and 525-565 nm, respectively. After 10 s of measurement, 5 μM histamine in BBS was injected. Changes in the FRET signal were calculated by the $F_{\text{ECFP}}/F_{\text{Venus}}$ ratio (R).

Docking model.

The Nrz protein structure was obtained by running the Nrz amino-acid sequence on the Phyre² homology modeling server. The Nrz BH4 domain structure was extracted, and a docking

experiment was performed against the IP₃R1 Binding Domain crystal structure (pdb: 1N4K) using the PatchDock server. Images were acquired using UCSF Chimera software.

YSL ER isolation.

ER isolation was performed as described previously (Popgeorgiev et al., 2011). The 100,000 x g pellet was re-suspended in TNE buffer containing a cocktail of phosphatase inhibitors and was used for anti-FLAG immunoprecipitation.

In vivo calcium imaging.

Embryos injected with 250 μ M CalciumGreen-1 Dextran were dechorionated and mounted in low melting point 0.7% agarose in E3 medium on the stage of a Zeiss LSM 780 microscope and incubated at 28.5°C. Stacks of 4 μ m were acquired, and the sum of the first three stacks was utilized to visualize [Ca²⁺] variation in the external YSL.

Statistical Analysis.

Error bars displayed on graphs represent the mean \pm SD of at least three independent experiments. Statistical significance was analyzed by Student's *t*-test; *p* < 0.001 was considered significant.

Supplementary Materials

Supplementary Materials and Methods

Figure S1: Nr2 regulates IICR independently of its anti-apoptotic function

Figure S2: Sequence alignment of BH4 domains of Nr2 orthologs.

Movie S1: [Ca²⁺] variation in the YSL of WT embryo.

Movie S2: [Ca²⁺] variation in the YSL of Nr2Cb5-expressing embryo.

Movie S3: [Ca²⁺] variation in the YSL of Nr2AAACb5-expressing embryo.

References and Notes

- (1) R.J. Youle, A. Strasser, The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9 (2008) 47–59.
- (2) I. Bosanac, T. Michikawa, K. Mikoshiba, M. Ikura, Structural insights into the regulatory mechanism of IP₃ receptor, *Biochim Biophys Acta.* 1742 (2004) 89–102.
- (3) B. Bonneau, J. Prudent, N. Popgeorgiev, G. Gillet, Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: The calcium connection., *Biochim Biophys Acta.* 1833 (2013) 1755–1765.
- (4) M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman, The versatility and universality of calcium signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1 (2000) 11–21.

- (5) O. Markova, P.-F. Lenne, Calcium signaling in developing embryos: Focus on the regulation of cell shape changes and collective movements., *Semin Cell Dev Biol.* 23 (2012) 298–307.
- (6) M.Y.F. Yuen, S.E. Webb, C.M. Chan, B. Thisse, C. Thisse, A.L. Miller, Characterization of Ca(2+) signaling in the external yolk syncytial layer during the late blastula and early gastrula periods of zebrafish development., *Biochim Biophys Acta.* 1833 (2013) 1641–56.
- (7) S.E. Webb, A.L. Miller, Calcium signalling during embryonic development., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4 (2003) 539–51.
- (8) M. Behrndt, G. Salbreux, P. Campinho, et al., Forces Driving Epithelial Spreading in Zebrafish Gastrulation, *Science* (80-). 338 (2012) 257–260.
- (9) E. Arnaud, K.F. Ferri, J. Thibaut, et al., The zebrafish bcl-2 homologue Nr2 controls development during somitogenesis and gastrulation via apoptosis-dependent and -independent mechanisms, *Cell Death Differ.* 13 (2006) 1128–37.
- (10) N. Popgeorgiev, B. Bonneau, K.F. Ferri, J. Prudent, J. Thibaut, G. Gillet, The Apoptotic Regulator Nr2 Controls Cytoskeletal Dynamics via the Regulation of Ca(2+) Trafficking in the Zebrafish Blastula., *Dev Cell.* 20 (2011) 663–76.
- (11) G. Monaco, E. Decrock, H. Akl, et al., Selective regulation of IP3-receptor-mediated Ca2+ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-XL., *Cell Death Differ.* 19 (2012) 295–309.
- (12) X.M. Yin, Z.N. Oltvai, S.J. Korsmeyer, BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax., *Nature.* 369 (1994) 321–3
- (13) T. Matsu-ura, T. Michikawa, T. Inoue, A. Miyawaki, M. Yoshida, K. Mikoshiba, Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells., *J Cell Biol.* 173 (2006) 755–65.
- (14) F. Yoshikawa, M. Morita, T. Monkawa, T. Michikawa, T. Furuichi, K. Mikoshiba, Mutational Analysis of the Ligand Binding Site of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor, *J Biol Chem.* 271 (1996) 18277–18284.
- (15) H. Ando, A. Mizutani, H. Kiefer, D. Tsuzurugi, T. Michikawa, K. Mikoshiba, IRBIT suppresses IP3 receptor activity by competing with IP3 for the common binding site on the IP3 receptor, *Mol Cell.* 22 (2006) 795–806.
- (16) M.C. Bassik, L. Scorrano, S.A. Oakes, T. Pozzan, S.J. Korsmeyer, Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca2+ homeostasis and apoptosis, *EMBO J.* 23 (2004) 1207–16.

- (17) Y.-P. Rong, G. Bultynck, A.S. Aromolaran, et al., The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 (2009) 14397–14402.
- (18) C. White, C. Li, J. Yang, et al., The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-XL modulation of the InsP3R., *Nat Cell Biol.* 7 (2005) 1021–8.
- (19) G. Monaco, T. Vervliet, H. Akl, G. Bultynck, The selective BH4-domain biology of Bcl-2-family members: IP(3)Rs and beyond., *Cell Mol Life Sci.* 70 (2013) 1171–1183.
- (20) N. Inohara, T.S. Gourley, R. Carrio, et al., Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death., *J Biol Chem.* 273 (1998) 32479–86.
- (21) Y. Guillemin, P. Lalle, G. Gillet, J.F. Guerin, S. Hamamah, A. Aouacheria, Oocytes and early embryos selectively express the survival factor BCL2L10, *J Mol Med.* 87 (2009) 923–940.
- (22) J. Carroll, K. Swann, D. Whittingham, M. Whitaker, Spatiotemporal dynamics of intracellular [Ca²⁺]_i oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes., *Development.* 120 (1994) 3507–17.
- (23) J.C. Cheng, A.L. Miller, S.E. Webb, Organization and function of microfilaments during late epiboly in zebrafish embryos., *Dev Dyn.* 231 (2004) 313–323.
- (24) M.B. Ferrari, J. Rohrbough, N.C. Spitzer, Spontaneous calcium transients regulate myofibrillogenesis in embryonic *Xenopus* myocytes., *Dev Biol.* 178 (1996) 484–97.
- (25) H. Li, J.D. Cook, M. Terry, N.C. Spitzer, M.B. Ferrari, Calcium transients regulate patterned actin assembly during myofibrillogenesis., *Dev Dyn.* 229 (2004) 231–42.
- (26) M. Köppen, B.G. Fernández, L. Carvalho, A. Jacinto, C.-P. Heisenberg, Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and *Drosophila*., *Development.* 133 (2006) 2671–81.
- (27) J. Prudent, N. Popgeorgiev, B. Bonneau, J. Thibaut, R. Gadet, J. Lopez, P. Gonzalo, R.Rimokh, S. Manon, C. Houart, P. Herbomel, A. Aouacheria, G. Gillet, Bcl-wav and the mitochondrial calcium uniporter drive gastrula morphogenesis., *Nat Comm*, In press

- (28) Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., and Barton, G.J.. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 25 (2009)1189–1191.

Acknowledgments: We would like to thank Pr. Mikoshiba for providing the IRIS construct and Dr. Popgeorgiev for its helpful remarks. This work was supported by AFMTéléthon. BB and AN are fellows of the Ministère de la Recherche.

Figures and Tables

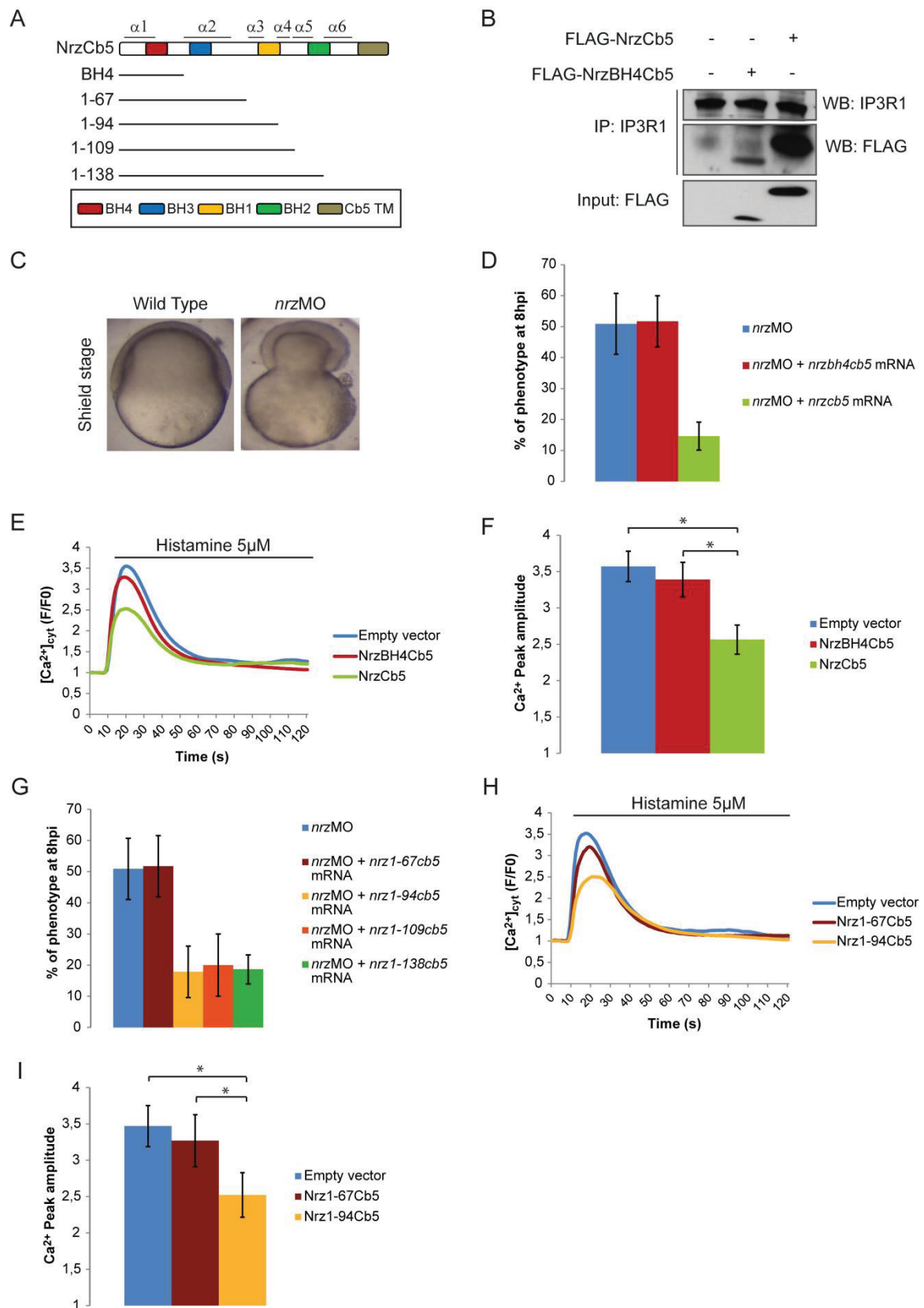
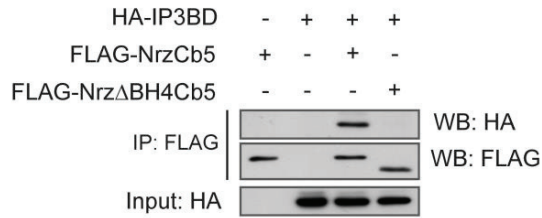


Figure 1. Nrz requires its BH4-BH1 encompassed region to regulate IICR. **A**, Schematic drawing of the full-length Nrz protein and the C-terminal deletion mutants. α -helices and BH domains are shown. **B**, Lysates from HeLa cells expressing the indicated protein were subjected to immunoprecipitation (IP) against endogenous IP₃R1. **C**, Phenotype induced by the injection of a morpholino against *nrz* (*nrz*MO) in one-cell-stage embryos. **D**, Percent of phenotype at 8 h post-injection (hpi) of embryos that were injected with *nrz*MO alone or in combination with the indicated mRNA. Results are shown as the mean \pm SD of at least three independent experiments. **E**, Representative response of HeLa cells expressing the indicated proteins. Cells loaded with the calcium-sensitive dye FluoForte were stimulated with 5 μ M histamine. **F**, Quantification of the histamine-induced Ca²⁺ peak. Results are shown as the mean \pm SD of at least five independent experiments. *, $p < 0.001$ (Student's *t*-test). **G**, Percent of phenotype at 8 hpi of embryos that were injected with *nrz*MO alone or in combination with the indicated mRNA. Results are shown as the mean \pm SD of at least three independent experiments. **H**, Representative response of HeLa cells transiently expressing Nrz1-67Cb5 or Nrz1-94Cb5 or transfected with empty vector and stimulated with 5 μ M histamine at the indicated time. **I**, Quantification of the histamine-induced Ca²⁺ peak. Results are shown as the mean \pm SD of at least five independent experiments. *, $p < 0.001$ (Student's *t*-test).

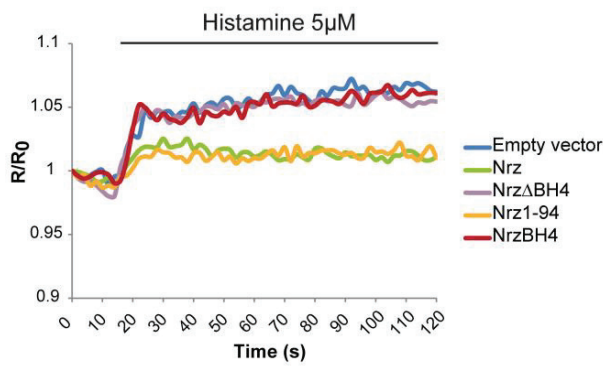
A



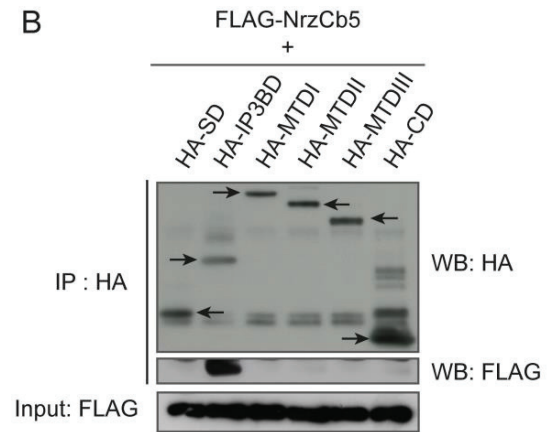
C



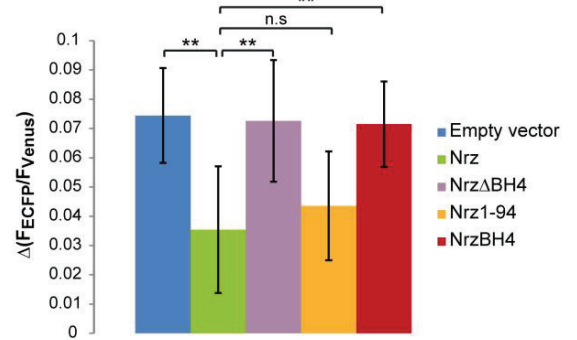
D



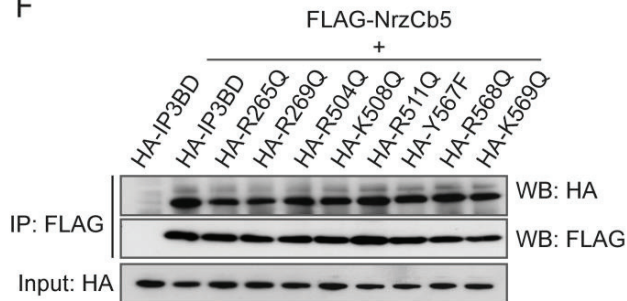
B



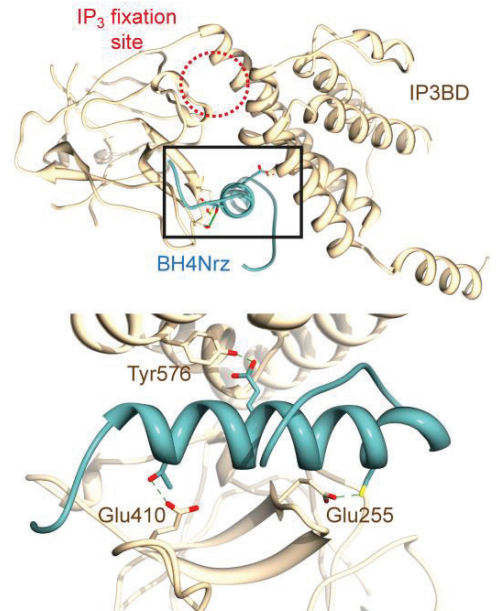
E



F



G



H

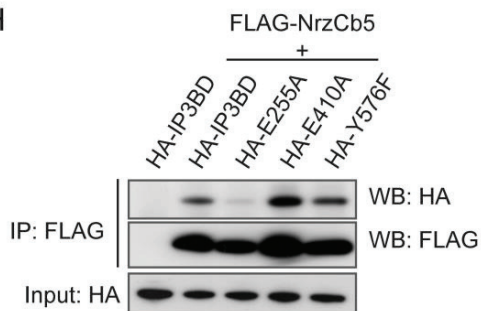


Figure 2. Nrz interacts with the IP₃ binding domain of zIP₃R1 to modify IP₃ binding. **A**, Schematic drawing of the zIP₃R1 primary structure. SD: Suppressor domain, IP₃BD: IP₃ binding domain, MTD: Modulatory and transducing domain, CFP: Channel forming domain, CD: Coupling domain. **B**, Lysates from HeLa cells expressing the indicated proteins were subjected to anti-HA IP. The bands corresponding to zIP₃R1 domains are indicated by an arrow. **C**, Lysates from HeLa cells expressing the indicated proteins were subjected to anti-FLAG IP. **D**, Representative curve of the FRET signal change of IRIS in HeLa cells stimulated with 5 μ M histamine and expressing the indicated proteins. The FRET signal was calculated as the ratio of fluorescence emission of ECFP to the fluorescence emission of Venus (R) with excitation at 405 nm. **E**, Quantification of the FRET signal change induced by histamine stimulation. The results are shown as the mean \pm SD of at least three independent experiments. **, $p < 0.0001$ (Student's *t*-test). **F**, Lysates from HeLa cells expressing Flag-NrzCb5 and different IP₃BD mutants were subjected to anti-FLAG IP. **G**, Docking model of the BH4 domain of Nrz on IP₃BD. The crystal structure of IP₃BD (PDB: 1n4k) was used, and the BH4 domain was modeled by multi-template homology with Phyre². Docking was performed using the PatchDock server. The dashed line red circle represents the IP₃ binding site. **H**, Lysates from HeLa cells expressing Flag-NrzCb5 and different IP₃BD mutants were subjected to anti-FLAG IP.

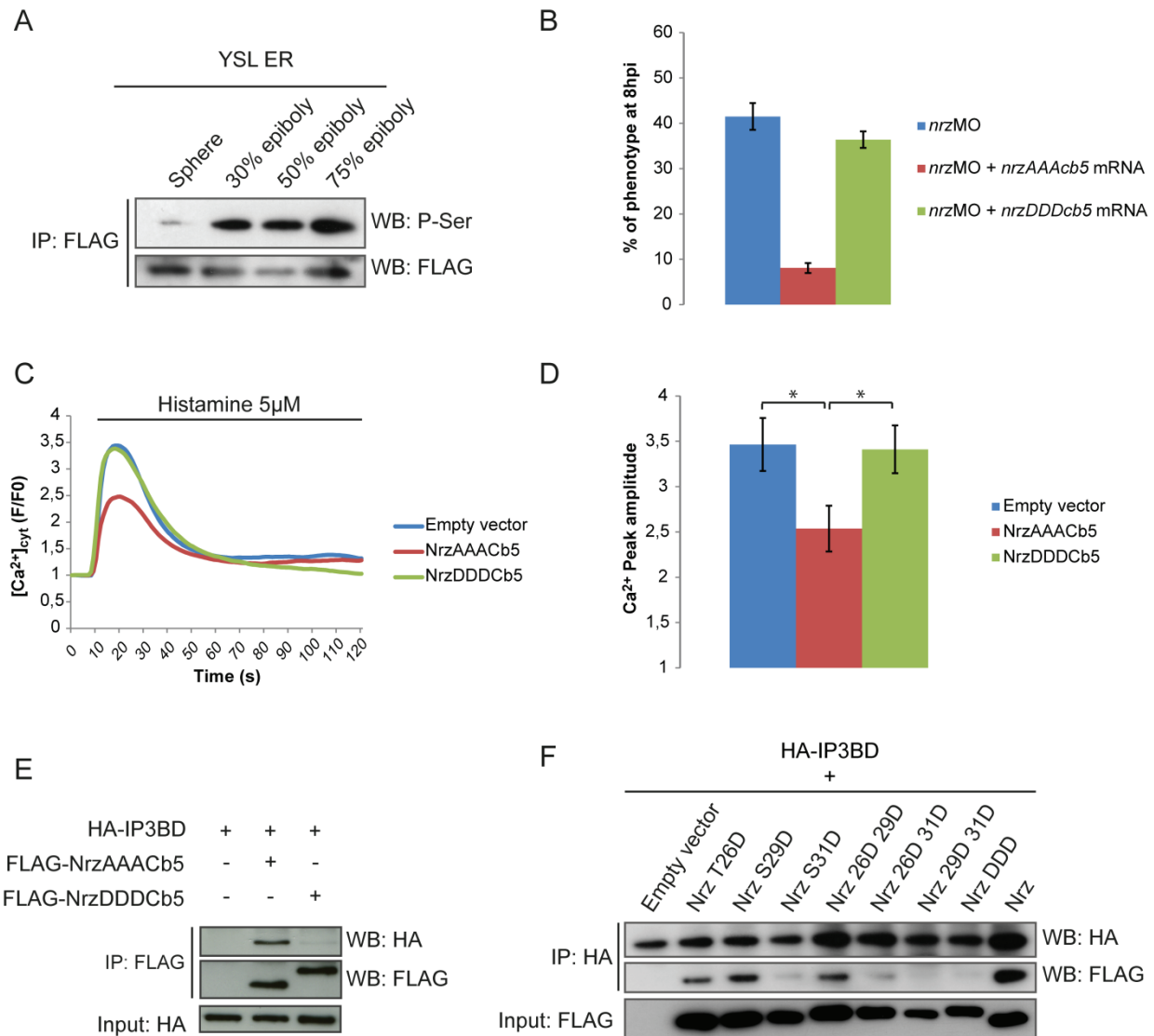


Figure 3. Nrz phosphorylation abolishes its binding to IP₃R1. **A**, ER isolated at the indicated stages from the YSL of embryos injected with mRNA encoding FLAG-NrzCb5 were subjected to anti-FLAG IP. IP samples were then analyzed by western blotting with an anti-phosphoserine antibody and an anti-FLAG antibody after stripping. **B**, Percent of phenotype at 8 hpi of embryos injected with *nrz*MO alone or in combination with the indicated mRNA. Results are shown as the mean \pm SD of at least three independent experiments. **C**, Representative response of HeLa cells transiently expressing the indicated proteins and stimulated with 5 μ M histamine. **D**, Quantification of the histamine-induced Ca²⁺ peak. Results are shown as the mean \pm SD of at least five independent experiments. *, $p < 0.001$ (Student's *t*-test). **E**, Lysates from HeLa cells expressing the indicated proteins were subjected to anti-FLAG IP. **F**, Lysates from HeLa cells expressing the indicated proteins were subjected to anti-HA tag IP.

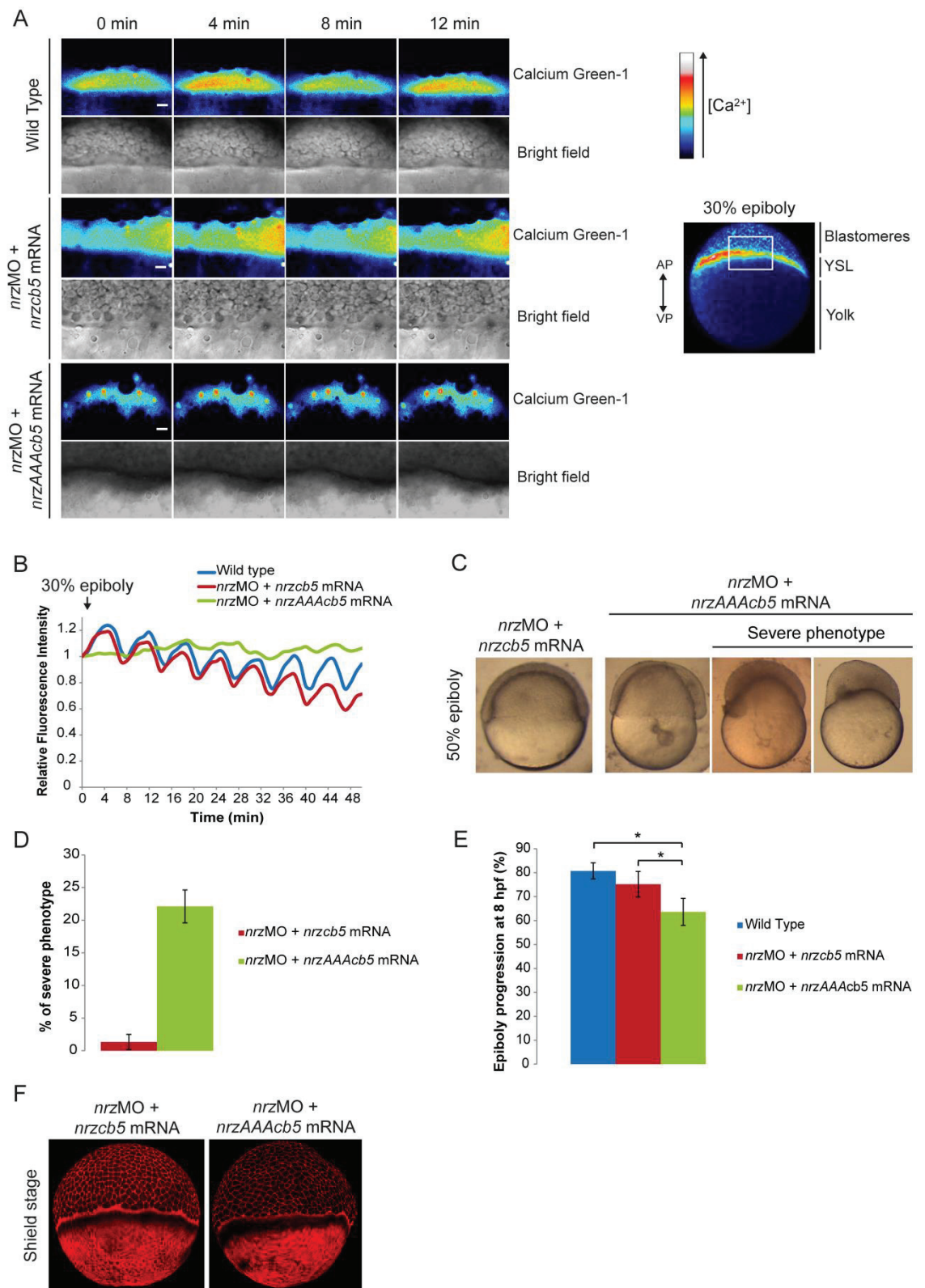


Figure 4. Nrz phosphorylation is required for cyclic Ca^{2+} waves and actin ring formation. **A**, $[\text{Ca}^{2+}]$ variation within the external-YSL of WT embryos or embryos injected with *nrz*MO and mRNA encoding NrzCb5 or NrzAAACb5. Embryos were injected at the 128-cell stage with the Ca^{2+} -reporting dye CalciumGreen-1 Dextran. Scale bar, 20 μm . **B**, Representative graphs of $[\text{Ca}^{2+}]$ variation within the external YSL of WT embryos or embryos injected with *nrz*MO and mRNA encoding NrzCb5 or NrzAAACb5. Graphs are representative of five embryos that were analyzed per condition. **C**, Bright field images of embryos injected with *nrz*MO and mRNA coding for NrzCb5 or NrzAAACb5 at 50% epiboly. **D**, Quantification of the severe phenotype induced by NrzAAACb5 expression. Results are shown as the mean \pm SD of three independent experiments. **E**, Measurement of epiboly progression at 8 h post-fertilization (hpf). Results are shown as the mean \pm SD of three independent experiments. *, $p < 0.001$ (Student's *t*-test). **F**, F-actin staining of embryos that were injected with *nrz*MO and mRNA encoding NrzCb5 or NrzAAACb5 at the shield stage.

Supplementary Materials

Supplementary Materials and Methods

Figure S1: Nrz regulates IICR independently of its anti-apoptotic function

Figure S2: Sequence alignment of BH4 domains of Nrz orthologs.

Movie S1: $[Ca^{2+}]$ variation in the YSL of WT embryo.

Movie S2: $[Ca^{2+}]$ variation in the YSL of NrzCb5-expressing embryo.

Movie S3: $[Ca^{2+}]$ variation in the YSL of NrzAAACb5-expressing embryo.

Supplementary Materials and methods

Immunoprecipitation.

For endogenous IP₃R and Bax coimmunoprecipitation experiments, 6x10⁶ HeLa cells were transfected with indicated vectors. After 24h, cells were lysed in TNE buffer (10 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 7,4), 1 mM β glycerophosphate, 1 mM orthovanadate, 0.1 mM sodium pyrophosphate containing protease inhibitors). Extracts were precleared with protein G-Sepharose beads for 1h at 4°C and then incubated with 5 μ g of anti-IP₃R or anti-Bax primary antibody overnight. Extracts were then incubated with protein G-Sepharose beads for 2h. Immunoprecipitated fractions were washed three times with TNE and analyzed by immunoblotting. For HA and FLAG immunoprecipitation 1x10⁶ HeLa cells were transfected with the indicated vector. 1 μ g of primary rabbit anti-HA or rabbit anti-FLAG was used.

Morpholinos, reagents and antibodies

Nrz morpholino (nrzMO) was designed according to the manufacturer's recommendations Gene Tools, LLC, with the following sequence: 5' CATTTTCCTCCCAGCGATGTCAGAC. *In vitro* mRNA transcription kit SP6 mMMESSAGE mMACHINE was purchased from Ambion. FluoForteTM was purchased from Enzo Life Sciences. CalciumGreenTM-1 Dextran and Rhodamine phalloidin were from Invitrogen. Histamine was purchased from Sigma-Aldrich.

Rabbit anti-IP₃ Receptor I antibody was from Thermo Scientific. Rabbit and mouse anti-FLAG antibodies were from Sigma-Aldrich. Rabbit anti-HA and rabbit anti-PARP antibodies were from Abcam. Mouse anti-HA antibody was from Covance. Mouse anti-Vinculin antibody was from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit anti-Bax antibody was from Cell Signalling. Mouse anti-phosphoserine antibody was from Millipore.

BBS (NaCl, 121mM; KCl, 5,4mM; MgCl₂, 0,8mM; CaCl₂, 1,8mM; NaHCO₃, 6mM; D-glucose, 5.5mM; HEPES, 25mM; pH 7.3)

Vector constructions and mRNA in vitro transcription

Nrz and zbax open reading frames were cloned in the pCS2+ expression vector as previously described (Arnaud et al., 2006). Transmembrane domain of Cb5 was cloned in pCS2+ as previously described (Popgeorgiev et al., 2011). Mutants of Nrz were inserted between the ClaI/XhoI restriction sites in pCS2+Cb5 or pCS2+ vectors. For *zip3r1* domains cloning, total

RNA from embryos was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions and complementary DNA was generated with a cDNA synthesis kit (iScript cDNA synthesis kit, Biorad) using 500 ng of total RNA. HA-tag was added in N-terminus to insure immunodetection. ZIP3R1 domains were cloned between ClaI/XhoI or EcoRI/XhoI sites in pCS2+. pCDNA3.1-IRIS was kindly provided by Pr. Mikoshiba (Matsura et al., 2006)

In vitro transcription for the different constructions was carried out using the SP6 mMESSAGE mMACHINE kit as recommended by the manufacturers.

Zebrafish lines and care

Zebrafish (crosses between AB and TU or AB and TL strains) were raised and maintained according to standard procedures as described in ZFIN (http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html). Zebrafish embryos were grown in E3 Medium (5 mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,33 mM CaCl₂; 0,33 mM MgSO₄; pH 7,6) at 28,5°C.

Embryo Manipulation.

Morpholino (0,5 mM) and mRNA (100 ng/ml) injections were performed at one to four cell stages. CalciumGreen-1 Dextran at 250 µM was injected at 128-cell stage into the top of the yolk close to yolk/blastoderm margin.

In vivo staining.

F-Actin staining of embryos was performed as previously described (Köppen et al., 2006). In brief, embryos at the desired stage were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C and washed in 0.1% Triton in PBS (PBT). They were then permeabilized for 1 h in 0.5% Triton in PBS and subsequently incubated in block solution (10% goat serum, 1% DMSO, 0.1% Triton in PBS) for 5h. Embryos were then incubated in Phalloidin overnight at 4°C and then washed three times in PBT.

Sequence alignment

Nrz orthologs sequences were found on NCBI protein database. Alignment was performed using Clustal Omega tool at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Image of alignment was obtained using the Jalview software (28)

Primers

FLAG-NrzBH4

5' ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCCTGTTGGTTG
AGGAAC

Cb5 fusion: 5' ATATCTCGAGCGCCGACTCGCTGGGAGGCGTCTG

Δ TM: 5' ATATCTCGAGCTACGCCGACTCGCTGGGAGGCGTCTG

FLAG-Nrz1-67

5' ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCCTGTTGGTTG
AGGGAAC

5' ATATCTCGAGTTTGCTGGGATCTGCTCCGCA

FLAG-Nrz1-94

5' ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCCTGTTGGTTG
AGGAAC

Cb5 fusion: 5' ATATCTCGAGTCCAGTGAATGTGAAGATAGAGACCA

Δ TM: 5' ATATCTCGAGTCATCCAGTGAATGTGAAGATAGAGACCA

FLAG-Nrz1-109

5' ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCCTGTTGGTTG
AGGGAAC

5' ATATCTCGAGCTCCGAATTCTCTCCCCTGGA

FLAG-Nrz1-138

5' ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCCTGTTGGTTG
AGGGAAC

5' ATATCTCGAGACCCTCCCAGCCTCCGTTTT

TM Nrz

5' ATATCTCGAGACAGCACTGTTTGCAGCAGCAG

5' ATATCTCAGATCAGCGTACTAAGAGGAAGGTTAG

FLAG-NrzG85A

5' ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCCTGTTGGTTG
AGGGAAC

5' ATATCTCGAGTCAGCGTACTAAGAGGAAGGTTAGAC

Mutation: 5' AACTGGGCAAGGGTGGTCTCTAT

5' CACCCTTGCCCAGTTCATTTTCC

FLAG-Nrz Δ BH4

5' ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCAACAGACGCCTCCC

AGCGAGT

Cb5 fusion: 5' ATATCTCGAGTGTTTTTCATGGAGGACTCCTGGTTCA

Δ TM: 5' ATATCTCGAGCTATGTTTTTCATGGAGGACTCCTGGTTCA

FLAG-Nrz Δ TM

5' ATATATCGATATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCCTGTTGGTTG
AGGGAAC

5' ATATCTCGAGCTATGTTTTTCATGGAGGACTCCTGGTTCA

HA-SD

5' ATATATCGATATGTATCCTTATGATGTTTCCTGATTATGCTTCGGACAAGATGTC
CGTTTCCTCCAC

5' ATATCTCGAGTTACCACTTCATAAATAAAACAATCTTCCAGCTCG

HA-IP₃BD

5' ATATATCGATATGTATCCTTATGATGTTTCCTGATTATGCTAGCGACAACAAGGA
GGCTATTCTTAAAGG

5' ATATCTCGAGTTAGAACTGCTTGGCAATGTATTCCTGGTTC

HA-MTDI

5' ATATGAATTCATGTATCCTTATGATGTTTCCTGATTATGCTCGCTTCATGCAGAA
ACAGATCGGCTAC

5' ATATCTCGAGTTAATCCATGCCTTCATCACCTGACGCTT

HA-MTDII

5' ATATATCGATATGTATCCTTATGATGTTTCCTGATTATGCTGGAGGAGACGGAC
TTCCTGCAGA

5' ATATCTCGAGTTAGAGCGGCCCATGCTGAAATTCGTCA

HA-MTDIII

5' ATATATCGATATGTATCCTTATGATGTTTCCTGATTATGCTACCCCTGTTGGGCA
GACGAAGACT

5' ATATCTCGAGTTAAAGGTCTTCAGAGCGCAAGAAGAAGTC

HA-CD

5' ATATATCGATATGTATCCTTATGATGTTTCCTGATTATGCTGATACCTTCGCAGA
CCTCAGAAGCGA

5' ATATCTCGAGTTATCAGGCGGGCTGCTGGGGGTT

HA-BD R265Q

Mutation: 5' CGTGTTTTTGCAAACCACCGG

5' CCGGTGGTTTGCAAAAACACG

HA-BD R269Q

Mutation: 5' GAACCACCGGCCAGCAGTCCG

5' CGGACTGCTGGCCGGTGGTTC

HA-BD R504Q

Mutation: 5' ACCCAATCAGGAACGACAGAAAC

5' GTTTCTGTCGTTCTGATTGGGT

HA-BD K508Q

Mutation: 5' CGTGAACGACAGCAACTCATGAG

5' CTCATGAGTTGCTGTCGTTACG

HA-BD R511Q

Mutation: 5' CAGAACTCATGCAAGAGCAGAAC

5' GTTCTGCTCTTGCATGAGTTTCTG

HA-BD Y567F

Mutation: 5' CACAGCAGGACTTCAGGAAGAAC

5' GTTCTTCCTGAAGTCCTGCTGTG

HA-BD R568Q

Mutation: 5' CAGCAGGACTACCAGAAGAACCAG

5' CTGGTTCTTCTGGTAGTCCTGCTG

HA-BD K569Q

Mutation: 5' CAGGACTACAGGCAGAACCAGGA

5' TCCTGGTTCTGCCTGTAGTCCTG

HA-BD E255A

Mutation: 5' GACCTGCGATGCGCACCGGAAG

5' CTTCCGGTGCGCATCGCAGGTC

HA-BD E410A

Mutation: 5' GACAAAGAGGCGGAGAAGCCG

5' CGGCTTCTCCGCCTCTTTGTC

HA-BD Y573F

Mutation: 5' GAACCAGGAATTCATTGCCAAGC

5' GCTTGGCAATGAATTCCTGGTTC

NrzAAA

Mutation: 5' CAACAGGCGCCTCCCGCCGAGGCGGCGGAG

5' CTCCGCCGCCTCGGCGGGAGGCGCCTGTTG

NrzDDD

Mutation: 5' CAACAGGACCCTCCCGACGAGGACGCGGAG
5' CTCCGCGTCCTCGTCGGGAGGGTCCTGTTG

NrzT26D

Mutation: 5' CAGGACCCTCCCAGCGAGTCGGCG
5' CGCCGACTCGCTGGGAGGGTCCTG

NrzS29D

Mutation: 5' CAGACGCCTCCCGACGAGTCGGCG
5' CGCCGACTCGTCGGGAGGCGTCTG

NrzS31D

Mutation: 5' CAGACGCCTCCCAGCGAGGACGCG
5' CGCGTCCTCGCTGGGAGGCGTCTG

Nrz26-29D

Mutation: 5' CAGGACCCTCCCGACGAGTCGGCG
5' CGCCGACTCGTCGGGAGGGTCCTG

Nrz26-31D

Mutation: 5' CAGGACCCTCCCAGCGAGGACGCG
5' CGCGTCCTCGCTGGGAGGGTCCTG

Nrz29-31D

Mutation: 5' CAGACGCCTCCCGACGAGGACGCG
5' CGCGTCCTCGTCGGGAGGCGTCTG

Supplementary figures

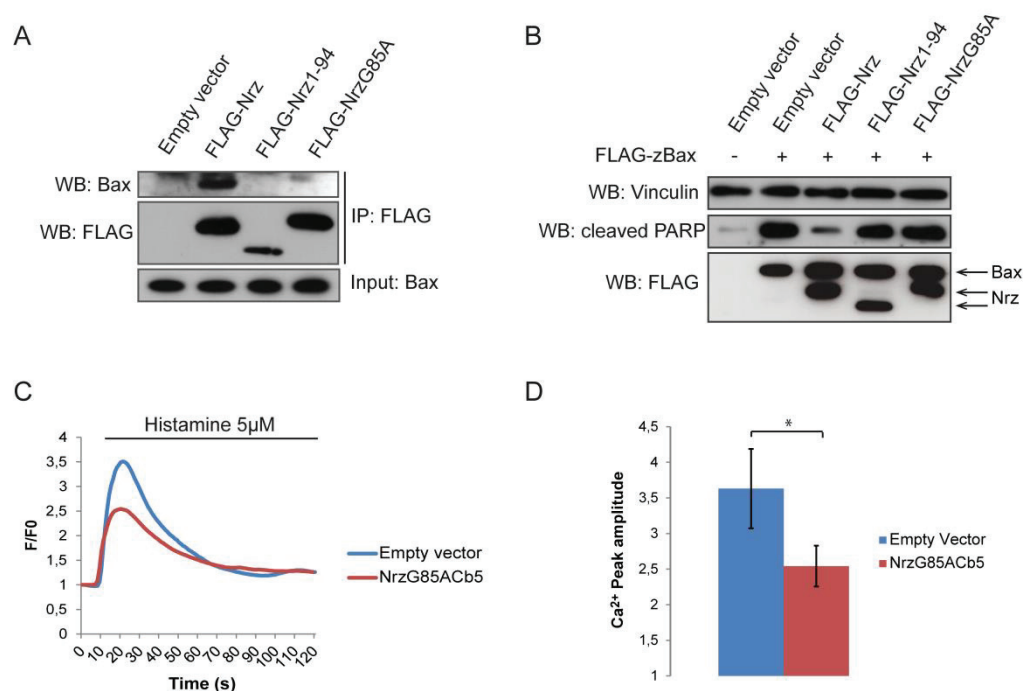


FIGURE S1. Nrz regulates IICR independently of its anti-apoptotic function. **A**, Lysates from HeLa cells expressing FLAG-tagged NrzCb5, Nrz1-94Cb5 or NrzG85ACb5 were subjected to IP against FLAG. Interaction with endogenous Bax was detected by western blotting. **B**, Lysates from HeLa cells expressing the indicated proteins were used for western blot. Cleaved-PARP, a product of activated caspases, indicates apoptosis level. **C**, Representative response of HeLa cells transiently expressing NrzG85ACb5 or transfected with empty vector and stimulated with 5 μM histamine at the indicated time. **D**, Quantification of the histamine-induced Ca²⁺ peak. The results are shown as mean ± SD of at least 5 independent experiments. *, $p < 0,001$ (Student's t test).

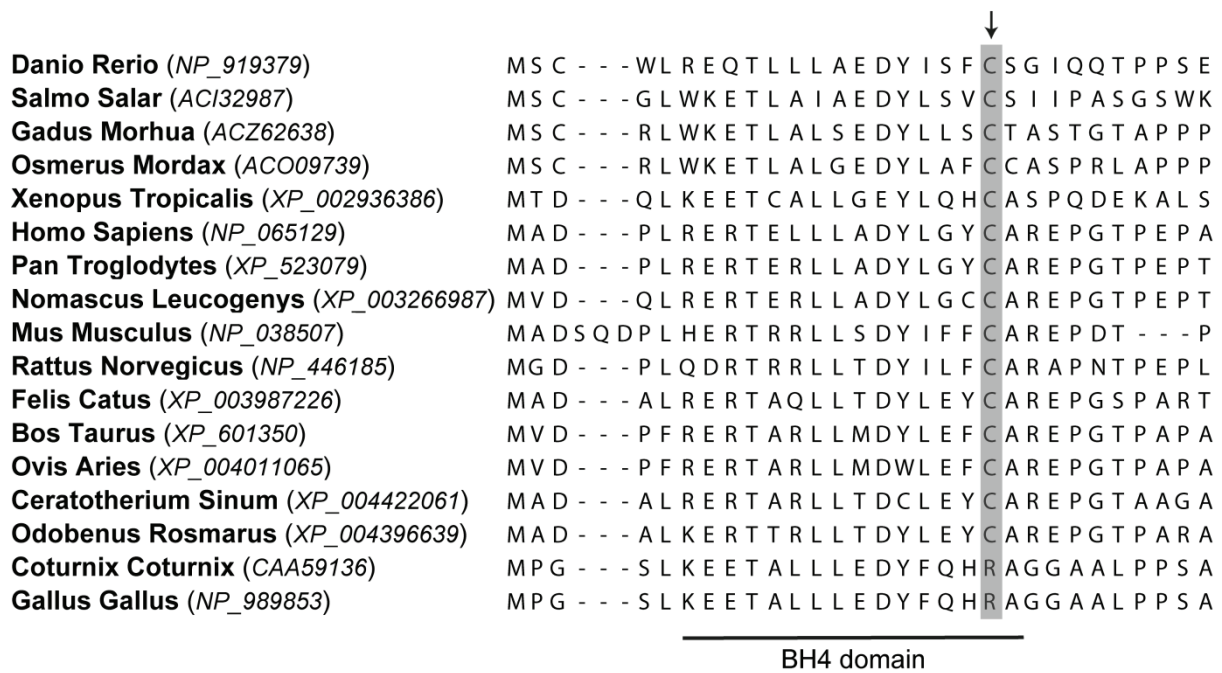


FIGURE S2. Sequence alignment of BH4 domains of Nrz orthologs. The 30 first amino acid sequences of different Nrz orthologs were aligned using Clustal Omega tool. Amino acids aligned with the cysteine 20 residue of Nrz are highlighted and showed by an arrow. Accession number is indicated in brackets.

MOVIE S1. [Ca²⁺] variation in the YSL of WT embryo. Time lapse microscopy performed on embryo injected with CalciumGreen-1 Dextran at 128-cells stage. Acquirement was performed from 30 to 50% of epiboly.

MOVIE S2. [Ca²⁺] variation in the YSL of NrzCb5-expressing embryo. Time lapse microscopy performed on embryo injected with *nrz*MO and mRNA coding for NrzCb5 at 1-cell stage and with CalciumGreen-1 Dextran at 128-cells stage. Acquirement was performed from 30 to 50% of epiboly

MOVIE S3. [Ca²⁺] variation in the YSL of NrzAAACb5-expressing embryo. Time lapse microscopy performed on embryo injected with *nrz*MO and mRNA coding for NrzAAACb5 at 1-cell stage and with CalciumGreen-1 Dextran at 128-cells stage. Acquirement was performed from 30 to 50% of epiboly

Article n°3

Bcl-wav and the mitochondrial calcium uniporter drive gastrula morphogenesis in zebrafish

Prudent J, Popgeorgiev N, Bonneau B, Thibaut J, Gadet R, Lopez J, Gonzalo P, Rimokh R, Manon S, Houart C, Herbomel P, Aouacheria A, Gillet G

Nature Communications, 2013 DOI 10.1038/ncomms3330

3 RÉSUMÉ ARTICLE N°3

Dans cette dernière étude, nous avons caractérisé la fonction et le mécanisme d'action d'un nouveau membre de la famille Bcl-2, Bcl-wav. Un travail de phylogénomie mené au laboratoire, et basé sur la méthode HMM (Hidden Markov Models), à partir du motif central de la structure des protéines Bcl-2 (hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$), a permis de mettre en évidence Bcl-wav (Bcl-2 homolog found in water-living anamniotes vertebrates). Ce gène présente un lignage spécifique et n'est retrouvé que chez les poissons osseux et les anoues. Cette protéine très divergente (17,55% d'identité avec Bcl-2 humain) est composée de 4 domaines BH, d'un domaine transmembranaire hydrophobe en C-terminal et présente une structure secondaire en hélice alpha, signatures typiques des protéines Bcl-2. Bcl-wav fait donc partie des membres « multi-domaines » de la famille Bcl-2.

Bclwav est un gène maternel exprimé de façon ubiquitaire au cours du développement précoce. Plus tardivement, le transcrit de *bclwav* est retrouvé majoritairement dans les somites et dans la tête. Des expériences de fractionnement cellulaire nous ont permis de démontrer que Bcl-wav est une protéine exclusivement mitochondriale et qu'elle est insérée dans les membranes de la mitochondrie.

La surexpression de Bcl-wav *in cellulo* ou *in vivo* induit l'activation de la caspase 3 et la mort cellulaire. De façon intéressante, cette mort cellulaire induite par Bcl-wav semble dépendre du complexe Bax/Bak. En effet, la surexpression de Bcl-wav, ne permet pas d'induire l'apoptose dans des cellules déficientes pour Bax et Bak. Nous avons montré par co-immunoprécipitation que Bcl-wav est capable d'interagir avec Bax et de l'activer en la relocalisant à la mitochondrie. De plus, l'effet pro-apoptotique de Bcl-wav peut être inhibé, à des degrés variables, par certains membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Nr2 et zBcl-xL. Ces données établissent donc clairement que Bcl-wav est un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2.

In vivo l'invalidation de *bclwav* entraîne une réduction de l'axe antéro-postérieur et un décalage gauche/droite de la notochorde à 24 hpf. Nos résultats montrent que l'invalidation de *bclwav* altère la migration des cellules mésodermes, suggérant que cet effet sur la formation de la notochorde est dû à un défaut des mouvements de convergence et d'extension lors de la gastrulation. En effet, ces mouvements sont indispensables pour la formation de l'axe antéro-postérieur et de la notochorde. Des analyses par vidéo-microscopie en temps réel ont montré que les cellules mésodermes des embryons invalidés pour *bclwav* ont une vitesse nette de

déplacement inférieure à celle des embryons contrôles. De façon intéressante, ceci semble corrélé à une altération de la dynamique du cytosquelette.

Pour élucider les mécanismes moléculaires du phénotype résultant de l'invalidation de *bclwav* nous nous sommes intéressés aux paramètres physicochimiques de la mitochondrie et nous avons constaté que le potentiel transmembranaire, le relargage du cytochrome c, la production de ROS ou la respiration mitochondriale ne sont pas modifiés. Cependant, l'invalidation de *bclwav* induit une augmentation de la concentration cytosolique de calcium cytosolique ainsi qu'une baisse de la concentration mitochondriale de calcium dans les blastomères lors de la gastrulation. Nous avons pu montrer que cela est dû à une diminution de la capacité des mitochondries à transporter le calcium cytosolique dans la mitochondrie. Il est clairement établi que le transport du calcium à travers la membrane mitochondriale externe se fait par le canal VDAC et nous avons montré par co-immunoprécipitation que Bcl-wav était capable d'interagir avec VDAC1. Cette interaction dépend du domaine BH4 de Bcl-wav et elle est essentielle pour le transport du calcium dans la mitochondrie. Finalement, nous avons montré que l'invalidation de *mcu*, l'uniporteur calcique mitochondrial, provoque un phénotype similaire à celui observé lors de l'invalidation de *bcl-wav*. De façon intéressante, Bcl-wav semble également interagir avec MCU, lui-même interagissant avec VDAC suggérant que Bcl-wav pourrait contrôler l'activité d'un complexe mitochondrial d'entrée du calcium. Ainsi, la régulation de la signalisation calcique à la mitochondrie apparaît comme essentielle pour la migration des cellules lors des mouvements de convergence et d'extension. Cette étude nous a donc permis d'établir que Bcl-wav joue un rôle primordial au cours de la gastrulation *via* sa capacité à favoriser l'entrée de calcium dans la mitochondrie.

ARTICLE

Received 28 Jan 2013 | Accepted 18 Jul 2013 | Published 14 Aug 2013

DOI: 10.1038/ncomms3330

Bcl-wav and the mitochondrial calcium uniporter drive gastrula morphogenesis in zebrafish

Julien Prudent¹, Nikolay Popgeorgiev¹, Benjamin Bonneau¹, Julien Thibaut¹, Rudy Gadet¹, Jonathan Lopez^{1,2}, Philippe Gonzalo^{1,2}, Ruth Rimokh¹, Stephen Manon³, Corinne Houart⁴, Philippe Herbomel⁵, Abdel Aouacheria⁶ & Germain Gillet¹

Bcl-2 proteins are acknowledged as key regulators of programmed cell death. However, increasing data suggest additional roles, including regulation of the cell cycle, metabolism and cytoskeletal dynamics. Here we report the discovery and characterization of a new Bcl-2-related multidomain apoptosis accelerator, Bcl-wav, found in fish and frogs. Genetic and molecular studies in zebrafish indicate that Bcl-wav and the recently identified mitochondrial calcium uniporter (MCU) contribute to the formation of the notochord axis by controlling blastomere convergence and extension movements during gastrulation. Furthermore, we found that Bcl-wav controls intracellular Ca^{2+} trafficking by acting on the mitochondrial voltage-dependent anion channel, and possibly on MCU, with direct consequences on actin microfilament dynamics and blastomere migration guidance. Thus, from an evolutionary point of view, the original function of Bcl-2 proteins might have been to contribute in controlling the global positioning system of blastomeres during gastrulation, a critical step in metazoan development.

¹ Université de Lyon, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, U1052 INSERM, UMS 3453 CNRS, Université Lyon I, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, Lyon 69008, France. ² Hospices Civils de Lyon, Fédération de Biochimie Nord, Hôpital de la Croix-Rousse, 103 Grande rue de la Croix-Rousse, Lyon Cedex 04 F-69317, France. ³ Université de Bordeaux, Institut de génétique et biochimie cellulaires, UMR 5095 CNRS, 1 rue Camille Saint-Saëns, Bordeaux Cedex 33077, France. ⁴ MRC Centre for Developmental Neurobiology, King's college, University of London, NHH, Guy's Campus, London SE1 1UL, UK. ⁵ Département de Biologie du Développement, CNRS-URA 2578, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, Paris Cedex 15 75724, France. ⁶ Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Ecole Normale Supérieure de Lyon, UMR 5239 CNRS-UCBL-ENS Lyon, Université de Lyon, SFR BioSciences Gerland, Lyon Sud (UMS3444/US8), 46 Allée d'Italie, Lyon Cedex 07 69364, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.G. (email: germain.gillet@univ-lyon1.fr).

Bcl-2 proteins are major regulators of programmed cell death. During early vertebrate development, they shape the embryo body through sustained cell homeostasis and tissue morphogenesis. At the molecular level, Bcl-2 proteins act by controlling the mitochondrial release of cytotoxic molecules such as cytochrome-c, leading to caspase activation and subsequent apoptosis. The permeabilization of the outer mitochondrial membrane (OMM), which represents a key step during apoptosis, is regulated by the insertion of the apoptosis accelerators Bax and Bak and prevented by Bcl-2 and related apoptosis inhibitors^{1,2}.

In addition to apoptosis, mitochondria has a central role in intracellular calcium homeostasis by rapidly transporting Ca^{2+} from the cytosol to the mitochondrial matrix^{3,4}. This process requires the passage of Ca^{2+} ions through the voltage-dependent anion channel (VDAC) at the OMM⁵. At the inner mitochondrial membrane, this process is completed via the mitochondrial calcium uniporter (MCU), which was described only recently^{6,7}. Members of the Bcl-2 family actively participate in the control of calcium homeostasis by binding to VDAC and controlling its Ca^{2+} permeability⁸. Despite these findings, the majority of studies have been performed *in vitro*, and the physiological relevance of this calcium control at the level of the whole organism, especially during the first steps of vertebrate development, remains unclear.

Zebrafish has become a powerful model organism for studying the role of genes related to early vertebrate development and apoptosis⁹. During this stage, a set of morphogenetic movements known as convergence and extension (C&E) begins; these movements shape the embryo body in a co-ordinated fashion. C&E movements are characterized by blastomere migration from the ventral to the dorsal region and at the animal pole, resulting in the formation of the anteroposterior and mediolateral axes¹⁰. Interestingly, during these early stages, *bcl-2* and related genes are actively transcribed, which suggests their implication in the zebrafish development¹¹. Moreover, Ca^{2+} signalling has a crucial role in early development, particularly during gastrulation¹².

Recently, we have characterized a Bcl-2-related anti-apoptotic protein, Nr3¹³. The Nr3 protein controls the first morphogenetic movement, known as epiboly, during early zebrafish development¹⁴. At the molecular level, epiboly is achieved through Nr3-dependent intracellular calcium control, highlighting the emerging role of Bcl-2 proteins as multifunctional cell factors during early vertebrate development.

Here we present the identification of the new apoptosis accelerator Bcl-wav, named for its expression in water-living vertebrates (anamniotes). The Bcl-wav protein shares structural and functional similarities, including its mitochondrial localization, with multidomain death accelerators. Knockdown of *bclwav* or *mcu* in zebrafish results in major alterations in the C&E movements of blastomeres during gastrulation, presumably due to alterations in F-actin dynamics. At later stages, we found that the maturation of the notochord and anteroposterior axis formation were compromised by *bclwav* or *mcu* silencing. At the molecular level, Bcl-wav interacted with both VDAC type 1 (VDAC1) and MCU, demonstrating that it is critical for mitochondrial Ca^{2+} uptake. Finally, Bcl-wav and MCU controlled the overall blastomere positioning system during gastrulation *via* the regulation of intracellular calcium trafficking. Together, our data support the notion that the Bcl-2 proteins have key roles in early development by controlling actin microfilament dynamics and thus also cell movement.

Results

Expression of *bclwav* during zebrafish development. We recently developed a set of structure-based hidden Markov model

profiles specific for cellular and/or viral-encoded proteins that share the same three-dimensional fold as Bcl-2 (ref. 15). These novel models reliably identified Bcl-2 family-related proteins in a vast array of metazoans, including members with low sequence similarity. During the course of these studies, we discovered a previously uncharacterized open-reading frame present in the zebrafish genome, which we believed was likely to encode a new Bcl-2 homologue. Subsequent BLAST searches identified expressed sequence tags (ESTs) with significant similarity to the corresponding putative product in teleosts and anurans; however, no corresponding EST was found in birds or mammals. This sequence was thus named Bcl-wav, for 'water-living anamniote vertebrates' (Fig. 1a). The *bclwav* sequence can be found in GenBank under accession number GU350411.1 (NCBI NP_001165873). Local alignment matrices showed that the zebrafish and *Xenopus* Bcl-wav proteins clustered with multidomain Bcl-2 members, consistent with Bcl-wav primary sequence analyses, which identified four Bcl-2 homology (BH) domains and a C-terminal transmembrane (TM) domain (Fig. 1b,c). Moreover, secondary structure predictions revealed an all-alpha helical structure, which is typical of Bcl-2-like proteins (Fig. 1c).

To investigate *bclwav* expression, we performed reverse transcriptase PCR experiments on zebrafish embryos. *Bclwav* mRNA could be detected as early as the 128-cell stage, that is, before the mid-blastula transition¹⁶, indicating that the *bclwav* transcript is maternally inherited (Fig. 1d). *Bclwav* expression was further analysed by *in situ* hybridization using two non-overlapping *bclwav* probes and one full-length *bclwav* probe. The same expression pattern was obtained with all three probes (Fig. 1d). Indeed, *bclwav* was ubiquitously expressed up to 14 h post fertilization (hpf), whereas at later stages (36–48 hpf) its expression became somite-specific. Interestingly, these results corroborated the fact that *bclwav* ESTs were found in muscle tissue (*Salmo salar*, smus1-014AD07.g1 and *Xenopus tropicalis*, XP_002940781.1), suggesting a conserved expression pattern across species.

Bcl-wav is a mitochondrial pro-apoptotic Bcl-2 family member.

To gain insight into the function of Bcl-wav, we first investigated its subcellular distribution *in vitro*. Confocal microscopy analyses showed that Bcl-wav was mainly localized in the mitochondria ($85 \pm 6.8\%$ co-localization with Mitotracker, $n = 5$; measured using Zeiss LSM 780 Zen software); however, the Bcl-wav Δ TM mutant, which lacked the C-terminal TM domain, was cytosolic (Fig. 2a,b and Supplementary Fig. S1a,b). Analyses of purified mitochondria from zebrafish embryos injected with *in vitro*-synthesized mRNAs encoding either full-length Bcl-wav or the Bcl-wav Δ TM deletion mutant showed that Bcl-wav Δ TM was unable to localize in the mitochondrial fraction (Supplementary Fig. S1b). Notably, deleting the BH4 domain did not affect Bcl-wav subcellular localization (Fig. 2b). Furthermore, the Bcl-wav protein appeared to be tightly anchored to the mitochondria, as demonstrated by an Na_2CO_3 treatment assay (Fig. 2c).

Next, we directly evaluated the subcellular localization of the endogenous Bcl-wav protein in zebrafish embryos using a rabbit polyclonal antibody. To this end, mitochondria and endoplasmic reticulum (ER) fractions purified from the yolk syncytial layer (YSL) of embryos at various stages of epiboly were analysed; these experiments showed that Bcl-wav was already present at the sphere stage and gradually accumulated during gastrulation (Fig. 2c,d). Together, these findings showed that Bcl-wav is a resident mitochondrial protein that is presumably inserted into the OMM *via* its hydrophobic TM domain. The activity of Bcl-wav was then analysed further. The ectopic expression of Bcl-wav in zebrafish embryos and HeLa cells demonstrated its capacity to

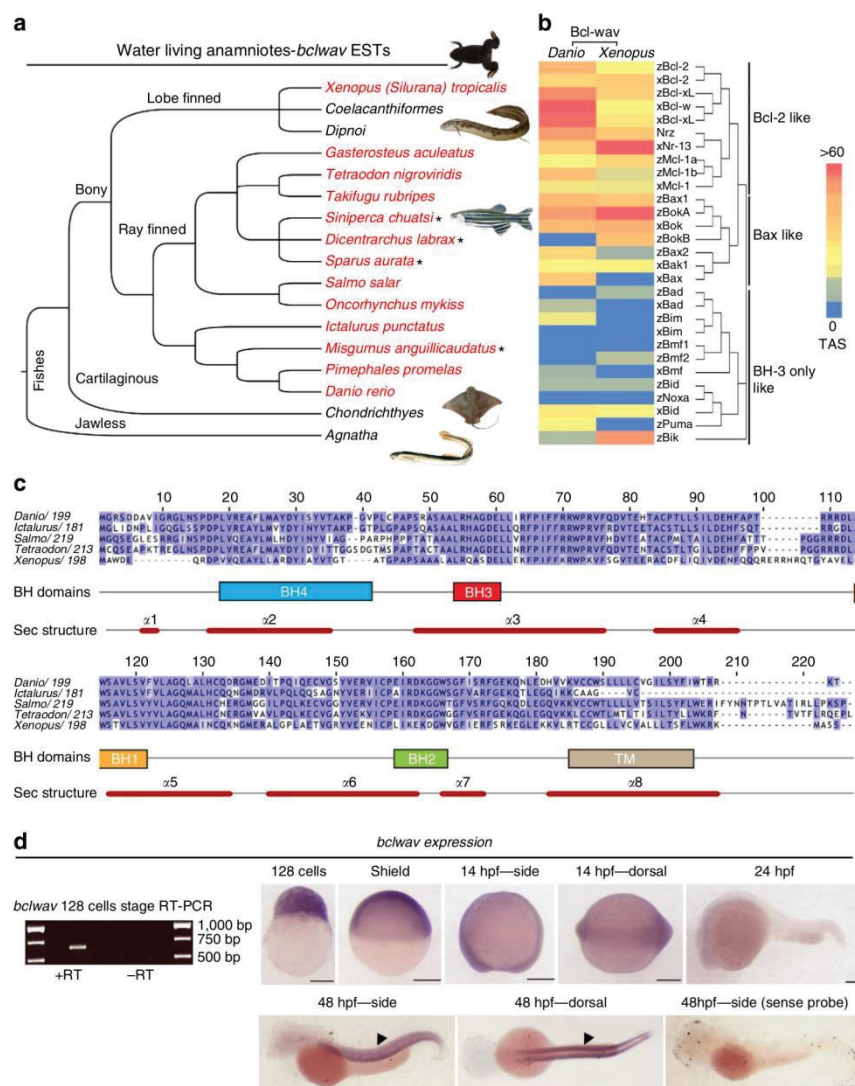


Figure 1 | Sequence and expression analysis of the *bclwav* gene. (a) Cladogram of *bclwav*-orthologous ESTs retrieved from GenBank, indicating the restricted phylogenetic distribution of the *bclwav* gene in aquatic anamniotes. Partial (*) and total *bclwav* ESTs were found in *Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Misgurnus anguillicaudatus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar*, *Gasterosteus aculeatus*, *Tetraodon nigroviridis*, *Takifugu rubripes*, *Dicentrarchus labrax*, *Siniperca chuatsi*, *Sparus aurata*, *Ictalurus punctatus* and *Xenopus tropicalis* (red lines). (b) *In silico* hybridization matrix representing the alignment of *D. rerio* (*Bcl-wav*) and *X. tropicalis* (*xBcl-wav*) *bclwav* orthologs versus the Bcl-2-related proteins found in these two species. Coloured boxes indicate to the total alignment score (blue, no alignment; red, high alignment score (>60)). *Bcl-wav* and *xBcl-wav* cluster mainly with multidomain Bcl-2 members. (c) ClustalW alignment of Bcl-wav primary structures in multiple species. Identical and similar residues are boxed in blue and cyan, respectively. The positions of conserved BH1-BH4 domains and of the C-terminal TM domain are indicated by coloured boxes below the sequences, and the locations of the predicted alpha helices are indicated by red stripes. (d) Reverse transcriptase PCR of poly(A)⁺ RNA extracted from whole embryos before the mid-blastula transition (MBT). *bclwav* expression was detected in embryos before the MBT (+ RT) (top left panel). A reaction lacking the RT enzyme (− RT) was used as a negative control. Top right and bottom panels show *bclwav* whole-mount *in situ* hybridization. Before MBT (128 cells), at the shield (6 hpf) and 14 hpf stages, *bclwav* is ubiquitously expressed. At 24 hpf, *bclwav* expression decreases. In addition, at 48 hpf, *bclwav* is highly expressed in the somites (black arrowheads). A negative control at 48 hpf using a sense probe is shown in the bottom right-outermost panel. Scale bar, 200 μ m.

activate caspase 3, in contrast to the Bcl-wav Δ TM mutant, which failed to do so (Fig. 2e,f and Supplementary Fig. S2a–c). Moreover, caspase activation was prevented by the apoptosis inhibitors zBcl-xL and Nr2 (Supplementary Fig. S2b). Notably, the Δ BH4 deletion mutant was still found to activate caspase 3 and lead to an increase in cleaved poly(ADP) ribose polymerase

(PARP), a target of caspases during apoptosis, indicating that the BH4 domain is dispensable for apoptosis induction by Bcl-wav (Supplementary Fig. S2c). In addition, Bcl-wav appeared to activate caspase 3 in a Bax/Bak-dependent manner, as shown using *bax/bak*-deficient mouse embryo fibroblasts (Supplementary Fig. S2d). Interestingly, the Bcl-wav/Bax

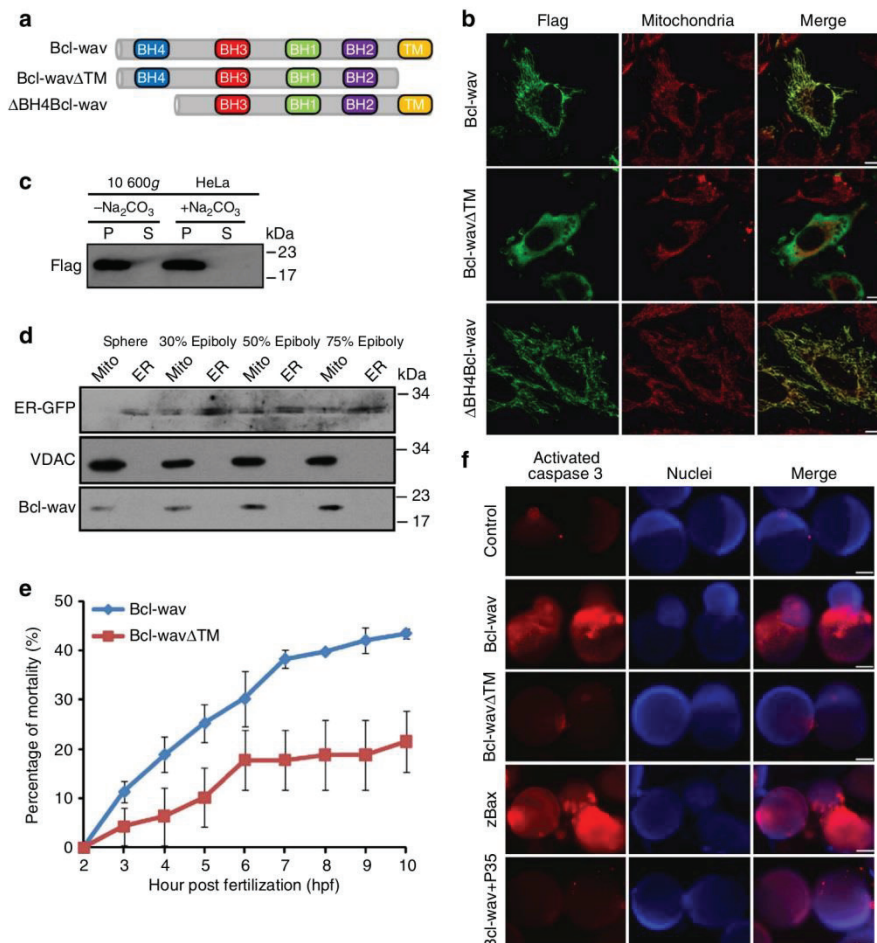


Figure 2 | Bcl-wav is a mitochondrial pro-apoptotic protein. (a) Schematic drawing of recombinant proteins: full-length Bcl-wav, Bcl-wavΔTM and ΔBH4Bcl-wav. The BH and TM domains are shown as coloured boxes. (b) Analysis of Bcl-wav subcellular localization by confocal microscopy in HeLa cells transiently transfected with pCS2 + Flag-Bcl-wav, pCS2 + Flag-Bcl-wavΔTM and pCS2 + Flag-ΔBH4Bcl-wav expressing Flag-Bcl-wav, Flag-Bcl-wavΔTM and Flag-ΔBH4Bcl-wav fusion proteins, respectively. Mitochondria were labelled using Mitotracker red dye, and Flag fusion proteins were detected using an anti-Flag antibody. In contrast to Flag-Bcl-wavΔTM, which is localized in the cytosol, Flag-Bcl-wav and Flag-ΔBH4Bcl-wav co-localize with mitochondria. Scale bar, 5 μm. (c) Flag-Bcl-wav is inserted into the mitochondrial membrane. Purified mitochondria from Flag-Bcl-wav-expressing cells were treated with sodium carbonate and immunoblotted with the anti-Flag antibody. Flag-Bcl-wav was found in the mitochondrial pellet (P) containing membrane-inserted proteins and was not found in the supernatant (S). (d) Bcl-wav is a mitochondrial zebrafish protein. Subcellular fractionation of YSL mitochondria and YSL endoplasmic reticulum (ER) of embryos expressing ER-GFP at the sphere stage and at 30%, 50% and 75% epiboly. Bcl-wav was detected in the mitochondrial fraction (Mito) and accumulates during gastrulation. VDAC and GFP antibodies were used as mitochondrial and ER markers, respectively. (e) The effect of *bclwav* overexpression on the mortality of zebrafish embryos. In contrast to *bclwavΔTM* mRNA, *bclwav* mRNA injection (100 ng/μl) into 1–4 cell stage embryos induces early mortality during gastrulation (mean ± s.d.; three independent experiments). (f) *Bclwav* overexpression promotes caspase 3 activation in zebrafish embryos at 50% epiboly. Left panels: activated caspase 3 staining in embryos injected at the one-cell stage with *egfp* (control), *zBax*, *bclwavΔtm*, *bclwav* and *bclwav* plus *p35* mRNAs. Embryos were observed at 30–50% epiboly. Middle panels: the same embryos were stained with Hoechst reagent to visualize the nuclei. Right panels: merged images of stained embryos. *Bclwav* overexpression induces YSL-specific caspase 3 activation (48%), which is abrogated by p35 co-injection (8%). Scale bar, 200 μm. Full scans of western blots can be found in Supplementary Fig. S9.

interaction was detected by co-immunoprecipitation assays in HeLa cells (Supplementary Fig. S2e). These results were confirmed by experiments in a yeast model, which showed that Bcl-wav could activate Bax and promote cytochrome-*c* release (Supplementary Fig. S3). Overall, these data suggest that Bcl-wav is a new potential death accelerator that shares structural similarities with multidomain Bcl-2 family members.

Bclwav knockdown leads to major developmental defects. Knockdown experiments with morpholinos were carried out to further investigate Bcl-wav role during development. In these experiments, anti-*bclwav* morpholinos were co-injected together with an anti-*p53* morpholino (*p53*-MO) to abolish the non-specific induction of *p53*-dependent cell death, a frequent off-target effect of morpholinos¹⁷. Notably, two different

morpholinos targeting distinct regions of the *bclwav* gene were used (*bclwav*MO1 and *bclwav*MO2), whereas a control morpholino (5mis-MO, termed controlMO) was used as a negative control. The efficiency of the *bclwav*MOs was confirmed by immunoblotting of mitochondrial extracts of

zebrafish embryos at 50% epiboly (Fig. 3a). *Bclwav* knockdown induced major developmental abnormalities, and similar phenotypes were obtained with both morpholinos (Fig. 3b). Most *bclwav* morphants (86%, $n=579$) (Fig. 3c and Supplementary Fig. S4a) were able to complete somitogenesis but showed

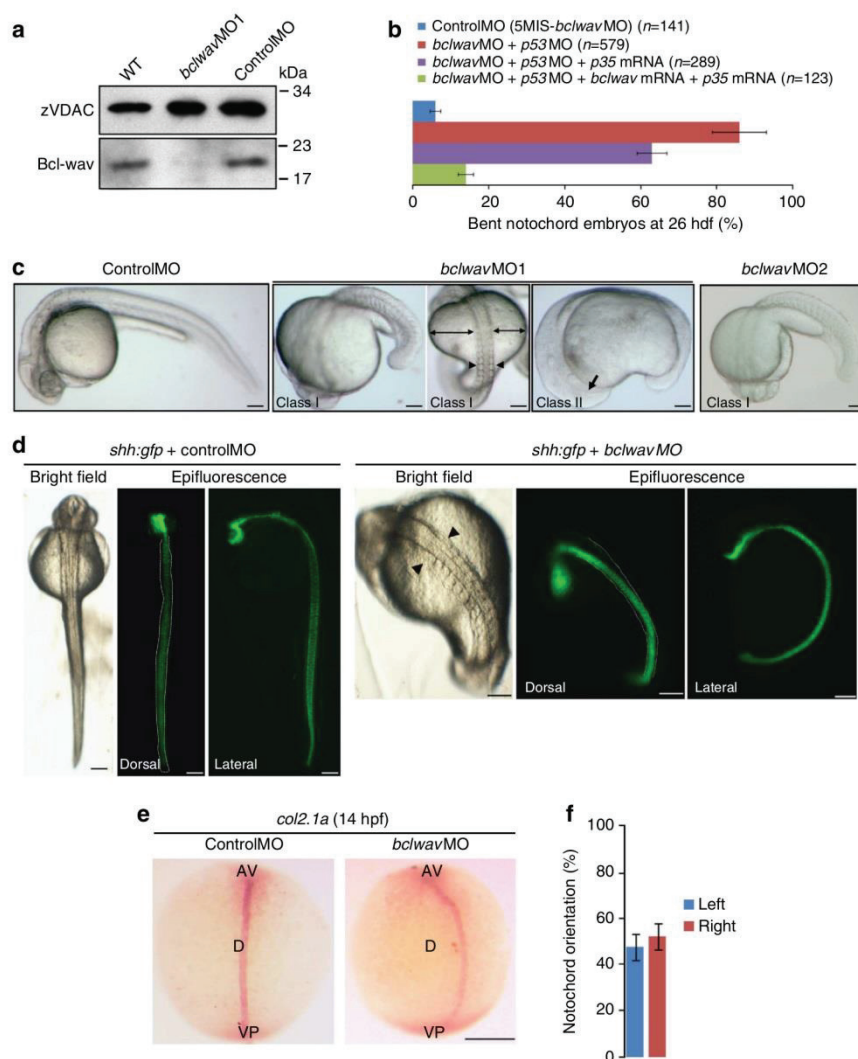


Figure 3 | *Bclwav* knockdown leads to major developmental defects. (a) Immunoblot analysis of *bclwav* morpholino efficiency in mitochondria purified from WT embryos and embryos injected with *bclwav*MO1 and controlMO at 50% epiboly (5 hpf) using anti-Bcl-wav polyclonal antibody. A specific signal that disappears following the injection of *bclwav*MO was detected. VDAC was used as an internal loading control. (b) Histograms representing the percentage of bent notochord phenotypes at 26 hpf in controlMO (5mis-MO + *p53*-MO) embryos versus *bclwav* morphants injected with *bclwav* or *p35* mRNAs. The ectopic expression of *p35* does not prevent the *bclwav*MO effect, indicating a caspase-independent phenomenon. Co-injection of *bclwav* mRNA (as well as *p35* mRNA) together with *bclwav*MO restores normal development (mean \pm s.d.; three independent experiments). (c) *Bclwav* knockdown phenotype at 26 hpf. Embryos injected with negative controlMO were normal (left panel). In contrast, embryos injected with antisense morpholinos (*bclwav*MO1 + *p53*-MO or *bclwav*MO2 + *p53*-MO) show similar class I (77%) and class II (9%) abnormal phenotypes. Embryos with the class I phenotype (left and middle panels) exhibit abnormal somites (black arrowheads), as well as bent notochord and anteroposterior axis (two-ended arrows). The class II phenotype is characterized by a major developmental delay, showing the lack of anteroposterior differentiation at 26 hpf (right panel, black arrow). Scale bar, 200 μ m. (d) Visualization of the bent notochord phenotype in the *bclwav* knockdown mutant using *shh:gfp* embryos compared with controlMO. In *bclwav* morphants, the notochord is shifted laterally (right panel), near the ear. Scale bar, 200 μ m. (e) *Col2.1a* whole-mount *in situ* hybridization at 14 hpf. In contrast to controlMO embryos, *bclwav*MO embryos exhibit a deviation of the *col2.1a* signal relative to the anteroposterior axis. AP, animal pole; D, dorsal; VP, vegetal pole. Scale bar, 200 μ m. (f) Histogram representing the percentage of individuals with notochord deviation (to the right or to the left) in *bclwav*MO embryos at 26 hpf (mean \pm s.d.; three independent experiments). Full scans of the western blots are provided in Supplementary Fig. S9.

anteroposterior axis reduction and abnormal somites. Moreover, the use of SonicHedgehogGFP (*shh:gfp*) transgenic embryos showed that *bclwav* morphants exhibited misplaced and bent notochords, randomly shifted to either the right or the left, giving rise to a typical bending of the embryo at 24 hpf (Fig. 3d–f). These results were confirmed by *in situ* hybridization in 14 hpf embryos using *col2.1* as a probe, highlighting the curvature of the notochord (Fig. 3e). Contrary to *bclwav* morphants, most controls appeared to be normal (94%, $n = 141$) (Fig. 3c). A minority of *bclwav* morphants (9%) exhibited an even more severe phenotype, as illustrated by premature developmental arrest shortly after the beginning of somitogenesis. The specificity of the *bclwav* morphant phenotype was confirmed by co-injecting *bclwav* mRNA with *bclwav*MO. Under these conditions, the injected embryo phenotype (86% normal, $n = 123$) was similar to that of the controls (Fig. 3c). In such complementation experiments, mRNA of the caspase inhibitor *p35* was co-injected with *bclwav* mRNA to prevent apoptosis due to Bcl-wav protein accumulation. Interestingly, at later stages (26 hpf), the somite alterations observed in *bclwav* morphants were correlated with a marked increase in caspase-dependent cell death events, as well as severe disorganization of the actin fibres in the somites, compared with control embryos (Supplementary Fig. S4b,c).

Overall, the results of these experiments suggest that *bclwav* knockdown causes developmental retardation and notochord bending, as well as somite malformation. Interestingly, ectopic expression of *p35* failed to restore normal development (bent notochord embryos: 63%, $n = 289$) (Fig. 3c). These observations suggest that the *bclwav*MO phenotype did not result from caspase activation.

Bcl-wav controls C&E cell movements during gastrulation. In vertebrates, the co-ordinated movements of the blastomeres during C&E ensure the establishment of the anteroposterior axis and the embryo body plan. We hypothesized that the malformations observed at later stages in *bclwav* morphants might result from impaired gastrulation. We first analysed the anterior progression of the dorsal progenitor cells during gastrulation. *Bclwav* silencing resulted in a significant shortening of the embryos, suggesting a defect in morphogenetic movements during gastrulation (Fig. 4a,b). We next analysed the progression of mesoderm progenitors, which contributes to the formation of the notochord, by performing *in situ* hybridization at 75% epiboly and using *no tail* (*ntl*) as a marker. In *bclwav* morphants, *ntl*-positive cells showed a disturbed anteroposterior distribution in the dorsal region (Fig. 4c). The length (l/L) and width (w/W) ratios of *bclwav* morphants ($l/L = 0.45 \pm 0.04$ and $w/W = 0.32 \pm 0.02$) were significantly lower and higher, respectively, than those of the controls ($l/L = 0.61 \pm 0.03$ and $w/W = 0.25 \pm 0.02$), suggesting a defect in the migration of these cells during gastrulation (Fig. 4d). Using time-lapse videomicroscopy, we specifically tracked the progression of the paraxial mesoderm, which undergoes C&E movements. The net progression of mesoderm cells towards the dorsal meridian axis was significantly affected in *bclwav* morphants (Fig. 4e). Analyses of their migration paths showed that, in contrast to the synchronously migrating control cells, the migration paths of many mesoderm cells in *bclwav* morphants were random (Fig. 4f). These results showed that although the mesoderm precursor cells migrated at a normal velocity in *bclwav* morphants, their progression towards the dorsal meridian axis was compromised. Because such alterations could be the consequence of cell autonomous or non-cell-autonomous phenomena, we set up a series of transplant experiments to observe the behaviour of morphant blastomeres in a wild-type (WT) environment. When implanted into WT receiving embryos,

blastomeres from control donors were found to spread along the dorsal axis due to cellular intercalation (Fig. 4g). In contrast, transplanted blastomeres from morphant embryos were unable to undergo such spreading, which resulted in altered C&E movements in the dorsal region of the morphant embryos (Fig. 4h). These results suggest that the origins of the observed defects were, at least in part, cell autonomous.

Bclwav knockdown alters F-actin dynamics during gastrulation. Cell migration depends strongly on actin microfilament dynamics. We thus monitored actin polymerization in control embryos and *bclwav* morphants using a green fluorescent protein (GFP)-tagged peptide that is able to bind F-actin (lifeactGFP). In control embryos, lateral mesodermal cells exhibited F-actin protrusions at the leading edge, which were oriented in the posterior–dorsal direction (Fig. 5a–d and Supplementary Movie 1). In contrast, F-actin protrusions in *bclwav* morphants were more randomly oriented (Fig. 5a–d and Supplementary Movie 2). Moreover, F-actin dynamics were also affected by *bclwav* silencing. In control embryos, F-actin protrusions were highly dynamic by polymerizing and depolymerizing periodically (average period: 80 s), whereas these protrusions persisted for much longer periods in *bclwav* morphants, indicating that the dynamics of the protrusions were severely altered (Fig. 5a,b). Overall, these results suggest that *bclwav* silencing led to mesoderm C&E migration defects as a consequence of impaired actin microfilament dynamics and polarity.

Bcl-wav sustains mitochondrial Ca^{2+} uptake via VDAC1. During gastrulation, Bcl-wav protein is exclusively mitochondrial. This led us to hypothesize that the observed C&E defects could be due to mitochondrial dysfunction. Surprisingly, none of the mitochondrial parameters analysed, including mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), ROS production, mitochondrial respiration or cytochrome-*c* release, appeared to be affected in *bclwav* morphants (Supplementary Fig. S5). However, when mitochondrial Ca^{2+} levels were measured using a dedicated fluorescent dye (Rhod-FF), we detected a significant decrease in mitochondrial Ca^{2+} content compared with control embryos (Fig. 6a–c). Moreover, this mitochondrial Ca^{2+} decrease was correlated with an increase in cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ and a decrease in the mitochondria to cytosolic calcium ratio, suggesting that Bcl-wav might control Ca^{2+} fluxes between mitochondria and the cytosol (Fig. 6a–c and Supplementary Movies 3 and 4). To test this hypothesis further, we evaluated the effect of ectopic Bcl-wav expression on mitochondrial Ca^{2+} uptake following an artificial increase in cytosolic Ca^{2+} levels in HeLa cells. Bcl-wav expression significantly increased mitochondrial Ca^{2+} uptake (Fig. 6d,e). We next evaluated the effect of *bclwav* knockdown on the capacity of purified mitochondria from zebrafish embryos to take up exogenous Ca^{2+} (20 μM). *Bclwav*-deficient mitochondria had a decreased Ca^{2+} uptake capacity compared with control mitochondria (Fig. 6f,g). VDAC1 is a major component of the apoptosis machinery; the pharmacological inhibition of VDAC using 2 mM NADH completely abolished Ca^{2+} entry into mitochondria, illustrating the critical role of VDAC as a Ca^{2+} channel^{5,18,19} (Fig. 6f,g). It was previously shown that Bcl-2 proteins, including Bcl-xL, could interact with VDAC²⁰ and modulate its activity via the BH4 domain²¹. We thus evaluated whether Bcl-wav can interact with VDAC1. To this end, Flag-tagged Bcl-wav was ectopically expressed in zebrafish embryos. Immunoprecipitation assays performed using purified mitochondria from embryos overexpressing Flag-Bcl-wav showed that full-length Bcl-wav interacted with endogenous zVDAC1 (Fig. 6h). Interestingly, Bcl-wav was also found to interact with

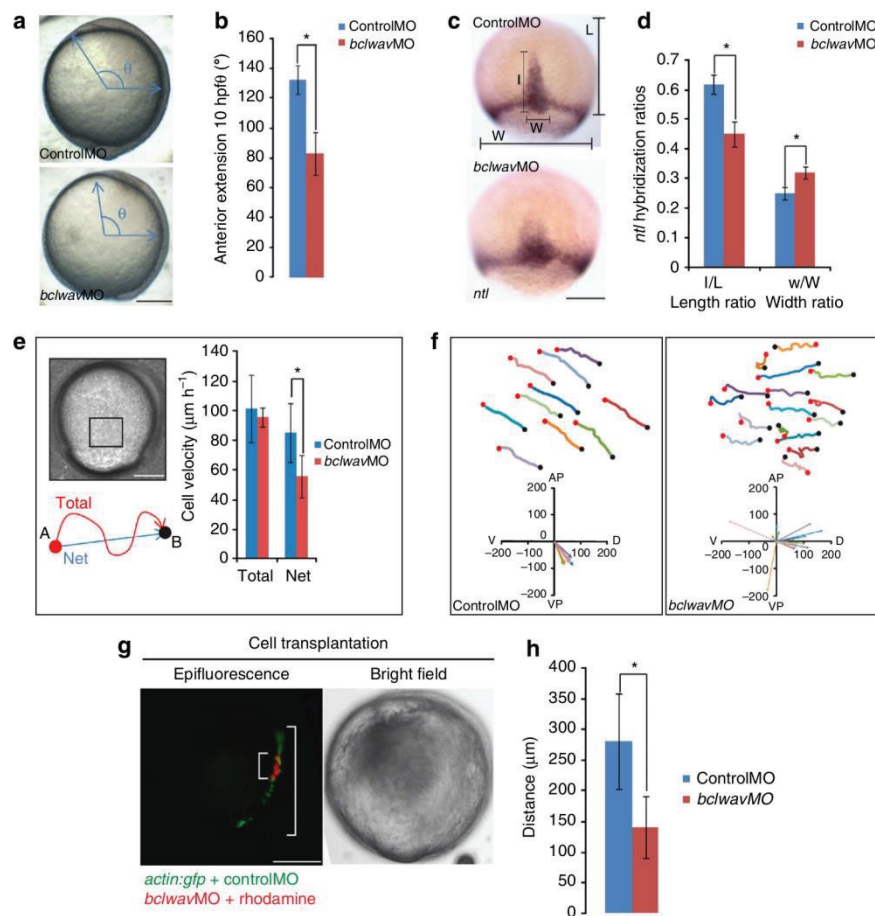


Figure 4 | Effect of *bclwav* knockdown on cell movement during C&E movements. (a) Representative bright field images of controlMO and *bclwav*MO at the tail bud stage, showing the delay in the progression of dorsal progenitors as measured by the angle between the head and the equator (θ). Scale bar, 200 μ m. (b) Histograms quantifying the θ angle difference between control embryos and *bclwav* morphants. *Bclwav* silencing induces a significant reduction in anterior extension (mean \pm s.d.; three independent experiments; $*P < 0.01$, Student's *t*-test). (c) *Ntl* whole-mount *in situ* hybridization at 75% epiboly. The *ntl*-positive mesoderm cells in *bclwav* morphants show disturbed anteroposterior migration at the dorsal pole relative to controlMO embryos. *Ntl*-positive signal length (l/L) and width (w/W) ratios are used to calculate mesoderm progression. Scale bar, 200 μ m. (d) Histograms representing the l/L and w/W ratios of controlMO embryos and *bclwav* morphants at the 75% epiboly stage (mean \pm s.d.; three independent experiments; $*P < 0.01$, Student's *t*-test). (e) Histograms representing the quantification of the total velocity (total distance, μ m h $^{-1}$) and net velocity (net dorsal progression, μ m h $^{-1}$) of the lateral mesodermal cells during C&E movements (at 75% epiboly). The net velocity of the mesodermal cells is significantly lower in *bclwav*MO than in control embryos (mean \pm s.d.; three independent experiments; $*P < 0.01$, Student's *t*-test). Scale bar, 200 μ m. (f) Cell paths and vector projections of isolated mesodermal cells observed during C&E movements at the 75% epiboly stage in embryos injected with controlMO or *bclwav*MO. Compared with the control cells, which migrate synchronously, *bclwav*MO lateral mesodermal cells exhibit more random migration paths. Images and diagrams are oriented as follows: AP, animal pole; D, dorsal; V, ventral; and VP, vegetal pole. (g) Observation of GFP-expressing cells injected with controlMO and morphant (*bclwav*MO + rhodamine) cells transplanted into WT embryos. Control cells (green) show a greater distribution along the dorsal axis than the *bclwav*-silenced cells (red). Scale bar, 200 μ m. (h) Histograms showing the distance covered by controlMO cells versus *bclwav*-silenced cells (controlMO: $n = 13$ embryos and *bclwav*MO: $n = 10$ embryos) (mean \pm s.d.; $*P < 0.01$, Student's *t*-test).

endogenous VDAC1 in HeLa cells (Fig. 6i), which might be expected because zebrafish and human VDAC1 are highly conserved (amino acid sequence identity: 85.5%). To determine whether Bcl-wav interacted with VDAC1 *via* its BH4 domain, immunoprecipitation assays in HeLa cells were also performed with Bcl-wav-deletion mutants in addition to full-length Bcl-wav. As shown in Fig. 6i, full-length Bcl-wav and Bcl-wav Δ TM interacted with VDAC1. Although no interaction with Δ BH4Bcl-wav was detected, the BH4 domain alone interacted with VDAC1.

In addition, in *bclwav* morphants, the Δ BH4Bcl-wav-deletion mutant neither restored normal development (Fig. 6j) nor prevented increases in cytosolic Ca^{2+} (Fig. 6k), in contrast to full-length Bcl-wav. This result suggests that the Bcl-wav/zVDAC1 interaction was functionally significant. Together, these findings suggest that Bcl-wav may control mitochondrial Ca^{2+} uptake *via* zVDAC1 during zebrafish gastrulation. Most interestingly, zBcl-xL completely reversed the effect of Bcl-wav on mitochondrial Ca^{2+} uptake (Fig. 6c,d). Indeed, the ability of zBcl-xL to

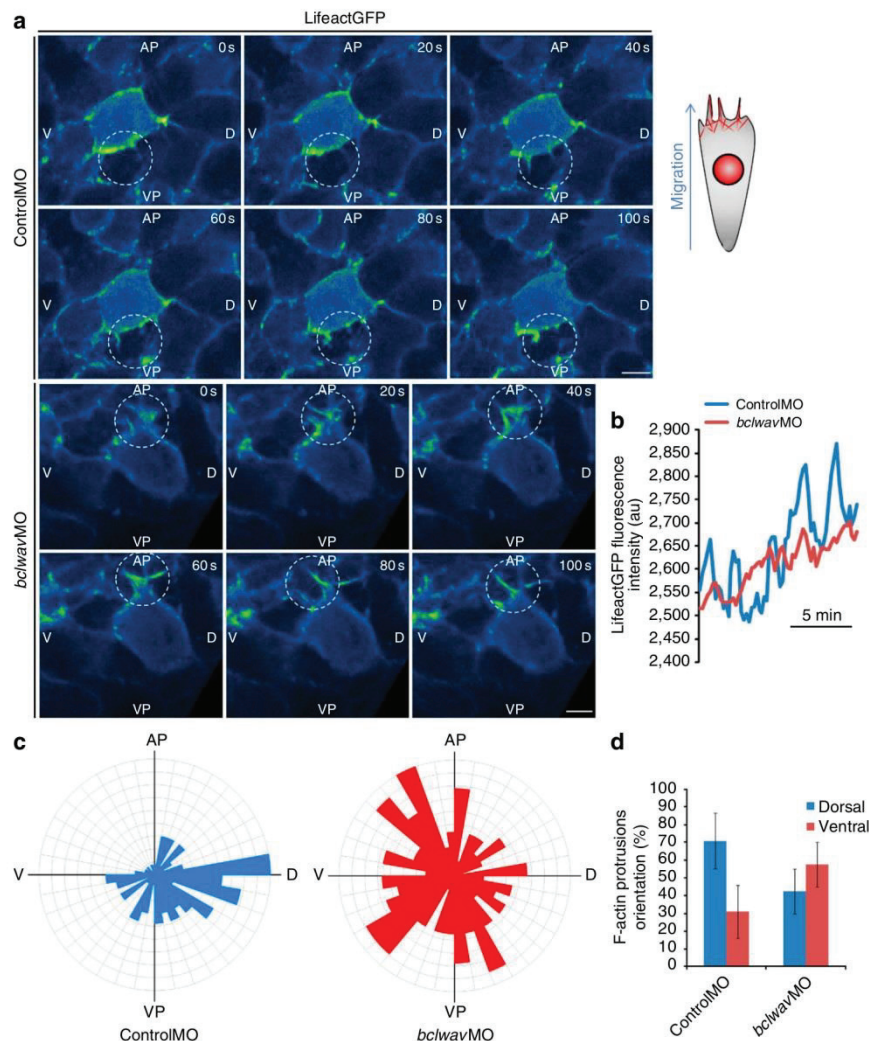


Figure 5 | *Bclwav* knockdown disrupts actin protrusion dynamics and orientation. (a) Confocal spinning disk microscopy analysis of F-actin dynamics in controlMO and *bclwav* morphants expressing *lifactgfp* at the 75% epiboly stage. F-actin-enriched cell protrusions are essential for cell migration. Cells from *bclwav*MO-injected embryos show altered F-actin polymerization positioning and dynamics (white circles). Image acquisition was performed on a single confocal section to visualize polymerized actin in lateral mesodermal cells. Scale bar, 10 μ m. (b) Graph representing the fluorescence intensity of LifactGFP-positive cells over 20 min of tracking. Control cells show periodic increases and decreases in fluorescence intensity corresponding to F-actin polymerization and depolymerization. In *bclwav*-silenced cells, these F-actin dynamics are strongly altered. (c) Circular rose diagrams of controlMO versus *bclwav*MO embryos representing the orientation of actin protrusions. These diagrams show the frequency of protrusions in a given orientation. The directionality of the F-actin protrusions is more random in *bclwav*MO embryos than in controlMO embryos. Diagrams are oriented as follows: AP, animal pole; D, dorsal; V, ventral; VP, vegetal pole. (d) Histograms representing F-actin protrusion orientations. The F-actin protrusions of control embryos are mainly oriented in the dorsal quadrant, whereas those in *bclwav* morphants are inverted (that is, in the ventral quadrant) (mean \pm s.d.; $n = 111$ and 141 cells for controlMO and *bclwav*MO, respectively; three independent experiments).

counteract the effect of Bcl-wav on Ca^{2+} uptake might also depend on VDAC1, given that Bcl-xL has previously been shown to bind to VDAC^{21–23}.

C&E movements strongly depend on mitochondrial Ca^{2+} uptake. Ca^{2+} acts as a major intracellular messenger that controls different cellular processes and has a critical role during zebrafish development¹². It has been clearly established that

cytosolic Ca^{2+} levels control actin dynamics and contribute to C&E movements in *Xenopus* and zebrafish^{24,25}. Our results strongly suggest that the migration defects observed following *bclwav* silencing were due to a decrease in mitochondrial Ca^{2+} uptake and subsequent Ca^{2+} accumulation in the cytosol.

To confirm this hypothesis, we directly tested whether disrupting mitochondrial Ca^{2+} uptake would lead to the same C&E alterations as observed in *bclwav*MO. To this end, we knocked down the *mcu*, which was recently reported to be the

major Ca^{2+} carrier in the inner mitochondrial membrane^{6,7}. *Mcu* silencing increased cytosolic Ca^{2+} levels and decreased mitochondrial Ca^{2+} levels (Fig. 7a), which correlated with major developmental alterations, including notochord deviation and anteroposterior axis reduction (Fig. 7b,c). Moreover, *mcu* knockdown also compromised blastomere migration (Fig. 7d) and altered F-actin dynamics and orientation (Fig. 7f,g), thus phenocopying the *bclwav* knockdown (Supplementary Movie 5). It should be noted that the concurrent silencing of *mcu* and *bclwav* did not cause additive developmental defects (Supplementary Fig. S6).

Conversely, we observed that the 'bent notochord' phenotype of the *bclwav* and *mcu* morphants could be rescued by co-injecting the EGTA derivative Bapta-1 AM, an efficient chelator of free Ca^{2+} (Fig. 7e). These results suggest that the developmental abnormalities observed in morphant embryos were the direct consequence of Ca^{2+} -trafficking alterations in blastomeres. During early zebrafish development, Ca^{2+} signalling is primordial during morphogenetic movements²⁶. Moreover, C&E movements appear to be partially under the control of the Wnt/PCP pathway and small GTPases such as RhoA; thus, these movements could be regulated by calcium signalling^{9,27}. We therefore investigated the effect of *mcu* knockdown on RhoA activation in human cells using a Rhotekin pull-down experiment. The efficiency of the small interfering RNA used in these experiments was previously validated *in cellulo* (Supplementary Fig. S7). The level of active RhoA was significantly lower in *mcu*-silenced cells than in control cells (Supplementary Fig. S8). Together, these results suggest that the cytosolic calcium accumulation observed in *bclwav* and *mcu* morphants may be responsible, at least in part, for the observed alteration of F-actin remodelling.

Bcl-wav/VDAC1/MCU complex controls mitochondrial Ca^{2+} uptake. Finally, we performed a set of *in cellulo* experiments to better characterize the effect of Bcl-wav on mitochondrial Ca^{2+} uptake. Bcl-wav was unable to increase mitochondrial Ca^{2+} uptake (Fig. 8a,b) in an *mcu*- or/and *vdac1*-null background, suggesting that VDAC1 and MCU may form a multiprotein Ca^{2+} channel that controls Ca^{2+} trafficking and blastomere movements during gastrulation. Indeed, Bcl-wav directly interacted with both VDAC1 and MCU, as shown by co-immunoprecipitation experiments in HeLa cells, suggesting that such interactions may also occur in the developing zebrafish (Fig. 8c,d). Importantly, contrary to the effects on mitochondrial Ca^{2+} uptake, the pro-apoptotic effect of Bcl-wav seems to be MCU independent. Indeed, Bcl-wav can still activate caspase 3 and induce PARP cleavage in *mcu* knockdown cells (Fig. 8e) or in *mcu* morphant embryos (Fig. 8f), and $\Delta\text{BH4Bcl-wav}$, which does not interact with VDAC1, was fully pro-apoptotic (Supplementary Fig. S2c). Consistent with these observations, a Bapta-1 AM probe was unable to rescue the embryonic mortality induced by *bclwav* mRNA (Fig. 8g).

Taken together, these results show that Bcl-wav enhances Ca^{2+} uptake into the mitochondria via VDAC1 and MCU and may accelerate apoptosis by activating Bax. During gastrulation, Bcl-wav and MCU serve as key factors in C&E movements by controlling mitochondrial Ca^{2+} trafficking and the dynamics of F-actin protrusions in migrating blastomeres (Fig. 8h).

Discussion

Here we report the identification and functional characterization of Bcl-wav, a new member of the multidomain Bcl-2 family of apoptosis regulators. This gene was identified using profile-based hidden Markov models, combining sequence and three-

dimensional structure information¹⁵. Interestingly, Bcl-wav was found in aquatic egg-laying species (teleosts and anurans) but not in mammals or birds, suggesting that Bcl-wav was evolutionarily selected for a specific role in the particular reproductive process of these egg-laying species. Indeed, some Bcl-2 members seem to have specialized roles in the control of oocyte survival and early embryo development^{13,28–30}. Combined bioinformatic and functional analyses identified Bcl-wav as a new multidomain Bcl-2 member³¹. We showed that Bcl-wav is able to bind to Bax and subsequently induce caspase activation. Thus, Bcl-wav seems to be an atypical member of the subfamily of multidomain death accelerators. The Bcl-wav protein is mostly a mitochondrial resident, suggesting that it may share some functional similarities with Bak, a multidomain protein that is not expressed during zebrafish development¹¹. In this regard, Bcl-wav is able to interact with VDAC1, a property shared with Bak^{9,32}. VDAC1 is known to permit Ca^{2+} transfer from the cytosol to the mitochondrial matrix¹⁹. This suggests that Bcl-wav could have a role in the control of intracellular Ca^{2+} fluxes. *Bclwav* knockdown resulted in a marked decrease in mitochondrial Ca^{2+} levels, together with an increase in cytosolic Ca^{2+} . Interestingly, knockdown of *mcu* also induced marked increases in cytosolic Ca^{2+} and phenocopied the *bclwav* knockdown phenotype, which not only demonstrates the critical role of MCU in vertebrate development but also suggests the existence of a multiprotein Ca^{2+} channel composed of VDAC1 and MCU. Indeed, Bcl-wav can interact with both VDAC1 and MCU, and these proteins can also interact with each other. In addition, the effect of Bcl-wav on mitochondrial calcium uptake depends on both VDAC1 and MCU. Thus, at the molecular level, it may be speculated that Bcl-wav maintains the VDAC1/MCU channel in an 'open state', allowing Ca^{2+} entry into the mitochondrial matrix. In this way, the fine-tuning of mitochondrial Ca^{2+} fluxes might be ensured by the combined effects of apoptosis accelerators, including Bcl-wav, and apoptosis inhibitors, such as Bcl-xL, on the permeability of the VDAC1 Ca^{2+} channel. In fact, Bax itself was reported to interact with VDAC³³, but also Bcl-xL²¹ that can modulate its permeability²². Our data support the model that Bcl-xL is able to inhibit massive Ca^{2+} entry into mitochondria. In this respect, it would be interesting to evaluate the existence of a 'ménage à trois' between Bcl-wav, Bcl-xL and VDAC1.

The observed phenotypes of *bclwav* and *mcu* morphants may tentatively be attributed, at least in part, to the observed effects on cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} pools. Indeed, during zebrafish gastrulation, C&E movements appear to be partially under the control of the Wnt/PCP pathway^{34,35}. This pathway activates small GTPases such as RhoA and Rac1, which are responsible for F-actin dynamics and polarization³⁶. Given that RhoA activation is decreased in *mcu* null cells, we hypothesize that *bclwav* and *mcu* silencing in zebrafish impair F-actin dynamics by altering Rho GTPase activity. Indeed, it has been demonstrated that an increase in cytosolic Ca^{2+} modulates Rac1 and RhoA activities, leading to alterations in cell migration and reversing the orientation of protrusions in neuronal cells³⁶. Interestingly, components of the Wnt/PCP pathway can also modulate Ca^{2+} signalling^{37,38}. These data are consistent with observations in zebrafish, showing that throughout gastrulation Ca^{2+} waves occur in the vicinity of the dorsal axis of the embryo, where C&E movements take place³⁹. During these Ca^{2+} waves, cells are exposed to high Ca^{2+} concentrations, which may be detrimental; thus, mitochondrial Ca^{2+} uptake is presumably critical for maintaining Ca^{2+} homeostasis in migrating blastomeres. In *bclwav* and *mcu* morphants, mitochondrial Ca^{2+} uptake appears to be compromised, as suggested by decreased mitochondrial Ca^{2+} levels; this may in turn explain the observed cytosolic Ca^{2+} increase. Thus, *bclwav* knockdown may alter C&E

movements *via* its effects on temporal and spatial Ca^{2+} signalling in the gastrula. This hypothesis accounts for the observed disruption of the distribution of *ntl*-positive cells in these morphants and the subsequent malformations. It was recently shown that embryos that are deficient in components of the Wnt/PCP pathway and thus have abnormal C&E movements also exhibited defects in somite and notochord formation⁴⁰.

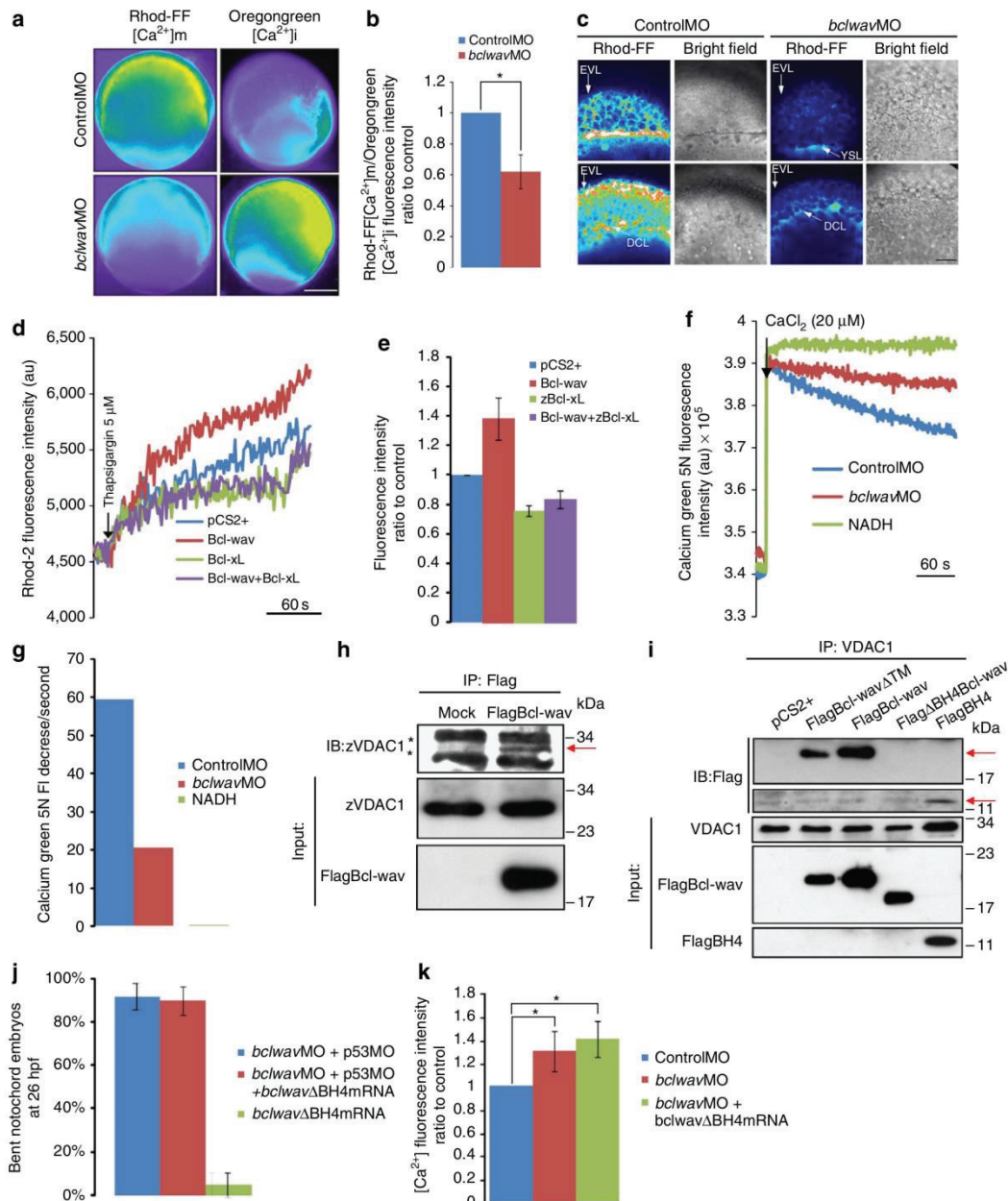
Together, our results support the hypothesis that Bcl-wav orchestrates morphogenetic movements by acting on intracellular Ca^{2+} trafficking *via* its interactions with VDAC1/MCU. These data raise the possibility that the primary role of Bcl-2 proteins during development might be to maintain cytoskeletal dynamics

by regulating intracellular Ca^{2+} fluxes. From an evolutionary point of view, the Bcl-2 family might be linked to the appearance of gastrulation in metazoans.

Methods

Zebrafish care. Experimental procedures followed the recommendations of the French Council on Animal Care (Arrêté du 27 décembre 1994). Protocols were approved by the Committee for animal experimentation Université Claude Bernard Lyon 1.

Zebrafish (AB/TU and AB/TL strains) were raised and maintained at 28.5 °C according to the standard procedures. Embryos were collected after fertilization and injected at the one-cell stage.



Morpholinos and mRNA. Morpholinos were designed according to the manufacturer's recommendations (Gene Tools, Philomath, OR, USA): *bclwav*MO1 (5'-CATCAGCTCAGATACACAGGTCA-3') hybridizes with *bclwav* mRNA from position -22 to +3 relative to the start codon; *bclwav*MO2 (5'-TCACAGCGTCGCTGACCGTCCCAT-3') hybridizes with *bclwav* mRNA from position +1 to position +25. We used the *bclwav*MO1 with five mismatches (underlined) as negative control: 5mis-MO (5'-CGTCAGATCGGATACTACAGGTTA-3').

Other morpholinos included *p53*-MO (5'-GCGCCATTGCTTTGCAAGAA TTG-3'), *mcu*MO (5'-CATCTCTGAAGTGAACCCGGCCGA-3') and *mcu*-5mis-MO (5'-GAGCTATGAATTGAACTCGGACGA-3'). Details regarding *bclwav* cloning (primer sequences are listed in Supplementary Table S1) and small interfering RNA experiments are provided in Supplementary Methods.

Bcl-wav protein and antibody production. The Bcl-wav protein (residues 1–177) was produced in BL-21 (DE3) bacteria, purified on a Ni-NTA-agarose column⁴¹ and subsequently used for polyclonal antibody production (Valbex, Villeurbanne). Rabbit serum immunoglobulin was purified on a protein A-agarose affinity column⁴².

In situ hybridization. For *bclwav* expression analysis, three probes were used: two were partial and non-overlapping (*bclwav*^{1–293} from position +1 to +293 and *bclwav*^{300–600} from position +300 to +600), and one represented full-length *bclwav*. Briefly, digoxigenin-labelled riboprobes were synthesized from pCS2 + *bclwav*, pCS2 + *bclwav*^{1–293}, pCS2 + *bclwav*^{300–600}, pCS2 + *ntl* and pCS2 + *col2.1a*. After permeabilization, embryos were hybridized overnight. Then, embryos were incubated with an anti-digoxigenin antibody (Roche; 1:10,000), stained and observed under a Leica MZ6 stereo-microscope⁴³.

Subcellular fractionation. All steps were carried out at 4 °C. Blastomere mitochondria, mitochondria and ER localized to the YSL of different embryo stages (before mid-blastula transition, sphere, 30%, 50% and 75% epiboly progression) were purified as follows: 100 embryos were added to 1 ml of cold MB buffer (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EDTA and 10 mM HEPES (pH 7.5) containing protease inhibitors), and the yolk sac was disrupted by pipetting up and down. Embryos were centrifuged for 2 min at 300 g to separate blastomeres and yolk cells. The pellet, containing blastomeres, was resuspended in 1 ml of MB buffer, and the cells were disrupted by shearing with a 1-ml syringe and a 26 G × 2/3 needle 50 times. The disrupted blastomeres and yolk cells were then centrifuged twice at 1,500 g for 5 min to eliminate nuclei and finally centrifuged at 10,600 g to pellet the mitochondria. Mitochondria were washed with 1 ml of MB buffer and resuspended in an appropriate volume of MB buffer for further analyses. The supernatant was centrifuged at 100,000 × g for 1 h, and the pellet containing the ER fraction was resuspended in RIPA buffer for further analysis.

Cell death assays. To study Bcl-wav pro-apoptotic activity, HeLa cells were transiently transfected with appropriate constructs and treated with dimethyl

sulphoxide (DMSO) or 10 μM thapsigargin 24 h later. Then, 24 h after drug treatment, cell death was quantified by annexin-V-Cy3 (Biovision) staining according to the manufacturer's protocols followed by flow-cytometry analysis using a FACScan (Becton Dickinson). Data were processed using CellQuest Pro software.

To analyse the effect of Bcl-wav on caspase activation, HeLa cells were transiently transfected with appropriate constructs alone or in combination. Twenty-four hours later, caspase-positive cells were labelled using the FLICA detection kit (ImmunoChemistry Technologies LLC). Pycnotic nuclei were labelled using Hoechst 33342. Cells were observed under a fluorescent microscope, and the percentages of caspase-positive and Hoechst-positive cells were determined (~100 cells per field).

For terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling assays, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS overnight at 4 °C, washed at room temperature and stored in methanol at -20 °C. After progressive rehydration in PBS, embryos were washed four times in PBS, 0.1% Tween 20 (5 min per wash). Permeabilization was performed for 15 min in PBS, 0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium citrate at +4 °C, cell death was quantitated using the POD *in situ* cell death detection kit (Roche). Cell death was detected by measuring the incorporation of FITC-labelled nucleotides by confocal microscopy.

For zebrafish caspase 3 assay, embryos (50% epiboly) were fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4 °C and stored in 100% methanol at -20 °C. After progressive rehydration in PBS, embryos were washed three times for 10 min in PBS + 0.1% Tween (PBST) and subsequently soaked for 1 h in blocking solution (10% heat-inactivated FBS and 3% BSA in PBST). Embryos were then incubated overnight at +4 °C with anti-activated caspase 3 antibody (1/500). Following three washes in PBST, 0.3% Triton and 1% DMSO, embryos were soaked in blocking solution for 1 h. Embryos were then incubated overnight at +4 °C with a goat anti-rabbit red fluorescent antibody (1/200 in blocking solution). Embryos were washed three times in 0.3% Triton X-100 and 1% DMSO in PBST, incubated with Hoechst 33342 (1/10,000) for 30 min, washed with 1 × PBS and stored in 80% glycerol. Embryos were analysed using a Nikon TE300 fluorescence microscope.

Immunoprecipitation. For zebrafish embryo immunoprecipitation experiments, mitochondria from embryos injected with or without Flag-Bcl-wav mRNA at 30% epiboly were purified as described above. Mitochondria were resuspended in 1% CHAPS buffer (1% CHAPS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.4) and protease inhibitors). Extracts were precleared with protein G-Sepharose beads for 2 h at 4 °C, and then 100 μg of mitochondria was incubated with 5 μg of anti-Flag M2 overnight. Extracts were then incubated for 3 h with 15 μl of protein G-Sepharose beads and centrifuged for 5 min at 5,000 r.p.m. Collected beads containing immunoprecipitated fractions were washed three times in CHAPS buffer, resuspended in SDS-PAGE sample buffer and analysed by immunoblotting using anti-VDAC1 antibody.

For HeLa cell immunoprecipitation experiments, 8 × 10⁶ HeLa cells were transfected with the appropriate constructs. After 24 h, cells were lysed in TNE buffer (10 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 7.4), 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM orthovanadate, 0.1 mM sodium pyrophosphate and

Figure 6 | Bcl-wav binds to zVDAC1 via its BH4 domain and controls mitochondrial calcium uptake. (a) Epifluorescence microscopy images of embryos at 75% epiboly stained with Rhod-FF or Oregon Green Bapta-1 AM fluorescent dyes measuring mitochondrial and cytosolic [Ca²⁺], respectively. False colour was applied to visualize the differences in the fluorescence intensities reflecting [Ca²⁺] changes. Dark blue: low [Ca²⁺]; yellow: high [Ca²⁺]. Scale bar, 200 μm. (b) Histograms showing fold changes in the Rhod-FF/Oregon Green Bapta-1 AM fluorescence intensities of *bclwav* morphants compared with controlMO (mean ± s.d.; three independent experiments; *P < 0.01, Student's *t*-test). (c) Confocal stacks of controlMO versus *bclwav*MO embryos stained with Rhod-FF dye at 75% epiboly. The enveloping cell layer (EVL), deep cell layer (DCL) and YSL of the embryo were analysed. Fluorescence intensities were visualized with false colour. Scale bar, 50 μm. (d) Representative response of transfected HeLa cells loaded with the mitochondrial Ca²⁺-sensitive dye Rhod-2. Mitochondrial Ca²⁺ uptake was stimulated with 5 μM thapsigargin (black arrow). Scale bar, 60 s. (e) Histograms depicting the quantitative response of the cells to 5 μM thapsigargin (mean ± s.d.; three independent experiments). (f) Analysis of the capacity of purified mitochondria from *bclwav*MO-, controlMO- or NADH (2 mM)-treated embryos (75% epiboly) to take up exogenous Ca²⁺ (20 μM CaCl₂). Calcium Green 5N fluorescent dye was used to measure the decrease in extramitochondrial [Ca²⁺], which directly reflects the mitochondrial uptake. Results are representative of two independent experiments. Scale bar, 60 s. (g) Histogram showing the capacity of purified mitochondria to uptake exogenous Ca²⁺ as represented by a decrease in Oregon Green 5N fluorescence intensity (FI)/second. Results are representative of two independent experiments. (h) Bcl-wav co-immunoprecipitates with endogenous zVDAC1 in purified mitochondria from zebrafish embryos. Immunoprecipitations were performed using homogeneity-purified mitochondrial extracts from embryos (30% epiboly). Left lane (Mock), non-injected embryos; right lane (Flag-Bcl-wav), embryos injected with Flag-tagged *bclwav* transcripts. In both samples, two non-specific bands are revealed by the anti-VDAC1 antibody, the lower corresponding to the immunoglobulin light chain (black stars); however, in the sample prepared from embryos injected with Flag-tagged *bclwav* transcripts, a 34-kDa band corresponding to zVDAC1 can be detected (red arrow). (i) Bcl-wav interacts with endogenous VDAC1 via its BH4 domain *in cellulo*. Immunoprecipitation experiments were performed with protein extracts from transfected HeLa cells. Flag-Bcl-wav and Flag-Bcl-wavΔTM were both able to interact with VDAC1 (upper red arrow) but not Flag-ΔBH4Bcl-wav; the FlagBH4 peptide domain also interacted with VDAC1 (lower red arrow). (j) Histograms showing the percentage of embryos with the bent notochord phenotype (26 hpf) among *bclwav* morphants co-injected with *ΔBH4bclwav* mRNA or *ΔBH4bclwav* mRNA alone (mean ± s.d.; three independent experiments). (k) Histograms indicating the fold changes in Oregon Green Bapta-1 fluorescence intensity of *bclwav* morphants injected or not with *ΔBH4bclwav* mRNA compared with controlMO (mean ± s.d.; three independent experiments; *P < 0.01, Student's *t*-test). Full scans of western blots can be found in Supplementary Fig. S10.

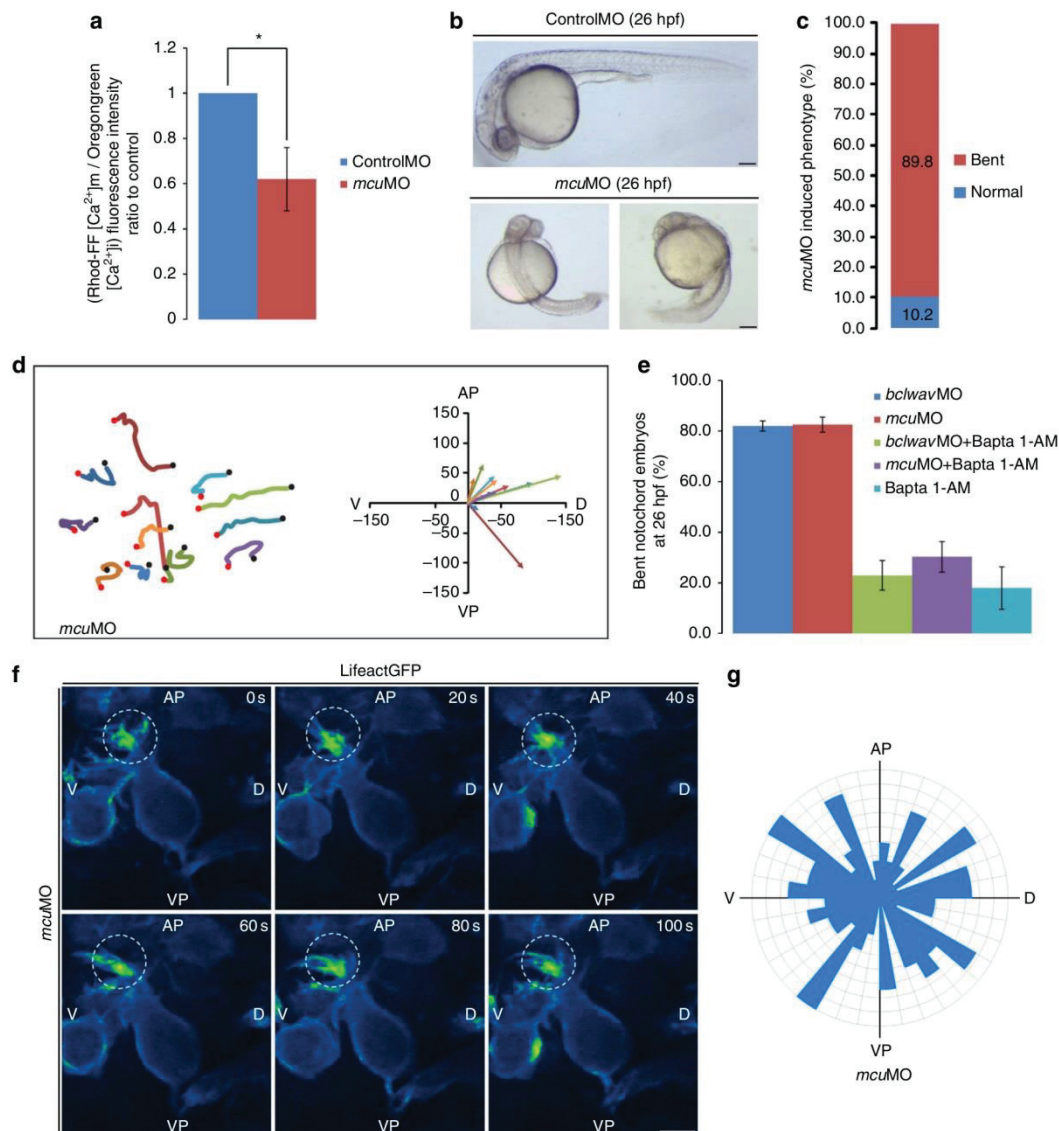


Figure 7 | *Mcu* knockdown phenocopies *bclwav* silencing. (a) Histograms indicating the fold changes in fluorescence intensity (Rhod-FF/Oregon Green Bapta-1 AM ratio) of *mcu* morphants compared with controlMO embryos (mean \pm s.d.; three independent experiments; * $P < 0.01$, Student's *t*-test). (b) Representative bright field images of *mcu*MO at 26 hpf showing reduced anteroposterior axis formation and notochord deviation; these phenotypes are macroscopically identical to those observed in *bclwav* morphants. Scale bar, 200 μ m. (c) Histogram showing the percentage of abnormal phenotypes (bent notochord phenotype) resulting from *mcu*MO injection at 26 hpf. (d) Cell paths and vector projections of single mesodermal cells observed during C&E movements at the 75% epiboly stage in embryos injected with *mcu*MO, showing random cell migration. Vector projections are oriented as follows: AP, animal pole; D, dorsal; V, ventral; and VP, vegetal pole. (e) Histograms showing the percentage of *bclwav*MO embryos (blue), *mcu*MO embryos (red), *bclwav*MO+Bapta 1-AM (green) and *mcu*MO+Bapta 1-AM (purple), or Bapta-1 AM alone (light blue) at 26 hpf with the bent notochord phenotype (mean \pm s.d.; three independent experiments). (f) Confocal spinning disk analysis of F-actin dynamics of *mcu* morphants expressing *lifeactgfp* at the 75% epiboly stage, showing the location (white circles) and kinetics (seconds, bottom right corner) of F-actin polymerization. Image acquisition was performed on a single confocal section to visualize polymerized actin in lateral mesodermal cells. Scale bar, 10 μ m. (g) Circular rose diagram of *mcu*MO embryos, the direction of F-actin protrusions is randomized compared with control embryo. Diagrams are oriented as follows: AP, animal pole; D, dorsal; V, ventral; and VP, vegetal pole.

protease inhibitors). Extracts were precleared with protein G-Sepharose beads and subsequently incubated overnight with 3 μ g of anti-VDAC1 or 1 μ g of anti-HA antibodies. Extracts were then incubated for 3 h with protein G-Sepharose beads

and centrifuged for 5 min at 5,000 r.p.m. Pellets containing immunoprecipitated fractions were washed five times in TNE buffer and analysed by immunoblotting. The RhoA activation assay is described in Supplementary Methods.

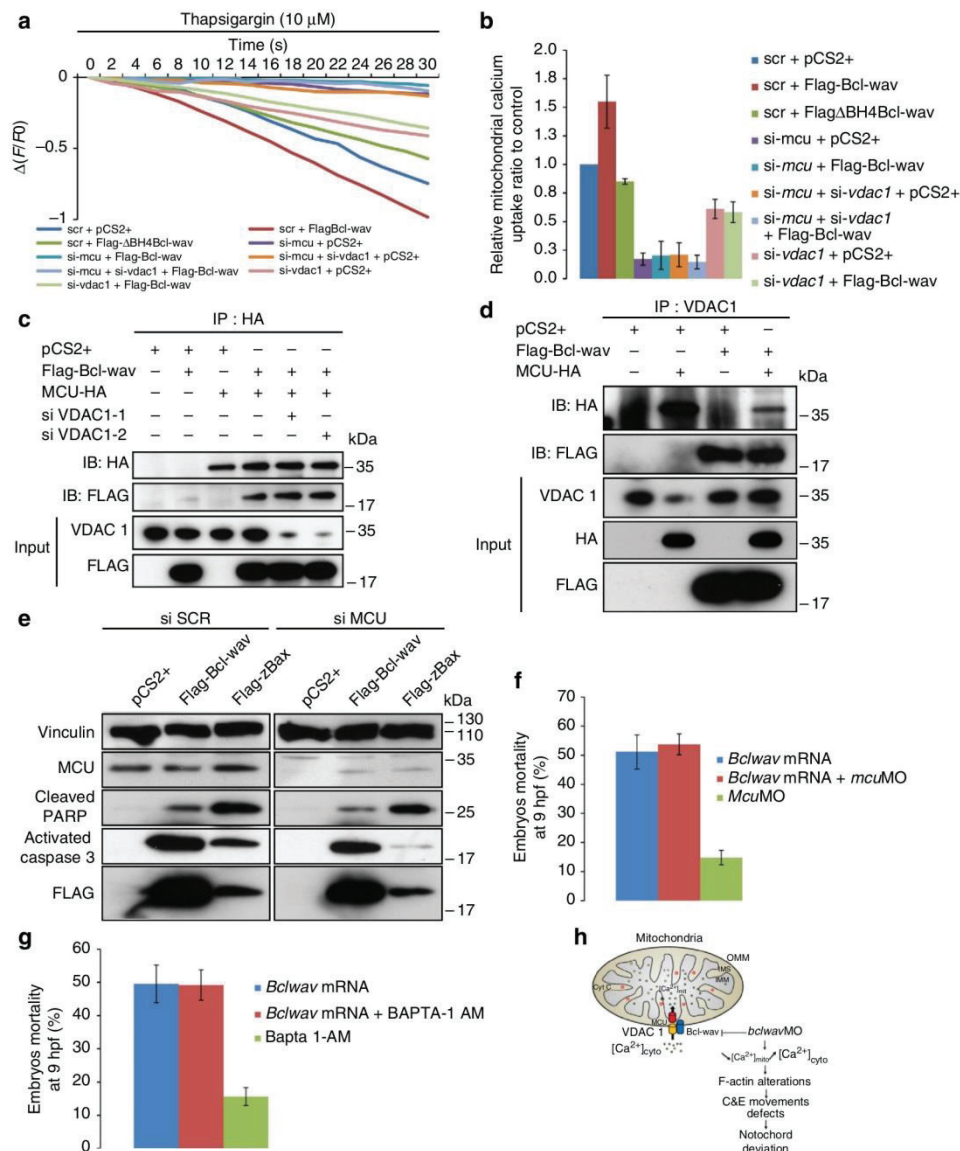


Figure 8 | The control of mitochondrial calcium by Bcl-wav, but not the induction of apoptosis, is VDAC1/MCU dependent. (a) Representative response of HeLa cells loaded with the intracellular Ca²⁺-sensitive dye FluoForte and stimulated with 10 μ M thapsigargin. The $\Delta F/F_0$ decrease represents the mitochondrial calcium uptake measured during a 30-s period after the maximum of fluorescence intensity was reached. Cells were transfected with control scrambled (scr-), *vdac1* (si-*vdac1*), *mcu* (si-*mcu*) or si-*vdac1* + si-*mcu* small interfering RNAs in combination with empty vector (pCS2+), pCS2 + Flag-Bcl-wav or pCS2 + Flag- Δ BH4Bcl-wav. (b) Mitochondrial calcium uptake induced by Bcl-wav is VDAC1/MCU dependent. Histogram plot representing the relative calcium uptake during 30 s after the maximum fluorescence intensity was achieved, normalized to that in scr + pCS2+ cells (mean \pm s.d.; three independent experiments). (c) Bcl-wav interacts with MCU-HA *in cellulo*. Co-immunoprecipitation was performed in protein extracts from HeLa cells (scr, si1- or si2-*vdac1*) transfected with pCS2 + Flag-Bcl-wav and pCS2 + MCU-HA using anti-HA antibody. Efficiency of si-*vdac1* was confirmed using an anti-VDAC1 antibody. (d) Bcl-wav, VDAC1 and MCU form a protein complex at the mitochondria. Immunoprecipitation of endogenous VDAC1 was performed in HeLa cells expressing the empty vector (pCS2+), Flag-Bcl-wav and/or MCU-HA. Both Flag-Bcl-wav and MCU-HA were detected in the co-transfected sample. (e) The pro-apoptotic activity of Bcl-wav is MCU independent. Caspase 3 is activated, and PARP is cleaved in both scr- and si-*mcu* HeLa cells transfected with pCS2 + Flag-Bcl-wav and pCS2 + Flag- Δ BH4Bcl-wav; this result is not observed in control cells. Vinculin protein was used for calibration purposes. HeLa cells transfected with pCS2 + Flag-zBax were used as positive controls. (f) Overexpression of *bclwav* is lethal in *mcu* morphant embryos. The injection of *bclwav* mRNA into WT or *mcu*MO embryos at the one-cell stage induces early mortality during gastrulation (mean \pm s.d.; three independent experiments). (g) Histograms showing the percentage mortality of embryos injected with *bclwav* mRNA and Bapta-1 AM, alone or in combination (mean \pm s.d.; three independent experiments), at 9 hpf. (h) Model of Bcl-wav function during early zebrafish development. At mitochondria, Bcl-wav interacts with VDAC1 and MCU to control Ca²⁺ entry. Bclwav knockdown increases free cytosolic Ca²⁺ levels, which may alter actin cytoskeletal dynamics, leading to changes in C&E movements and subsequent notochord deviation. Full scans of western blots are provided in Supplementary Fig. S11.

In vivo staining. For cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} measurements, one-cell stage embryos were injected with 10 μM Oregon Green 488 Bapta-1 AM or 10 μM Rhod-FF, alone or in combination with RNA or morpholinos. Embryos were then analysed at 75% epiboly using a Nikon TE300 fluorescence microscope.

For mitochondrial Ca^{2+} measurements in the YSL, enveloping layer and deep cell layer, one-cell stage was injected with 250 μM Rhod-FF with controlMO or *bclwv*MO. Embryos were incubated at 28.5 °C and subsequently analysed at 50–75% epiboly using a Zeiss 780 confocal microscope to specifically visualize each cell population. Images were acquired from 49 stacks of 4 μm each per embryo.

For F-actin staining, embryos were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4 °C and incubated with phalloidin⁴⁴.

Active mitochondria at the 50% epiboly stage were stained by incubating embryos for 30 min in 500 nM Mitotracker Red at 28.5 °C. Embryos were washed three times and visualized using a Nikon TE300 microscope.

Image acquisition was carried out with the same gain, amplification and exposure time for each experimental condition and corresponding control. Images were analysed using ImageJ software.

Mitochondrial calcium measurements in HeLa cells. Mitochondrial calcium in HeLa cells, transiently transfected with pCS2+, pCS2+ Flag-Bcl-wav and pCS2+ Flag-zBcl-xL, was measured by monitoring Rhod-2 fluorescence in cells cultured in 96-well plates using a Mithras LB 940 multimode microplate reader (Berthold Technologies). Cells were loaded with 5 μM Rhod-2 acetoxymethyl ester (Molecular Probes) in balanced salt solution (BBS) (121 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 , 6 mM NaHCO_3 , 5.5 mM D-glucose and 25 mM HEPES, pH 7.3) for 45 min at 37 °C. Following Rhod-2 loading, cells were incubated a further 30 min in fresh Ca^{2+} -free BBS at room temperature for dye de-esterification. Fluorescence values were obtained by excitation at 550 nm, and emission signal was collected at 580 nm every 400 ms. Thapsigargin in Ca^{2+} -free BBS was injected in each well after 15 s of measurement at a final concentration of 5 μM .

Extramitochondrial free Ca^{2+} was monitored in scr-, si-mcu and/or si-vdac1 HeLa cells transiently transfected with pCS2+, Flag-Bcl-wav or Flag- $\Delta\text{BH4Bcl-wav}$ using the FluoForte probe (Enzo). Cells were loaded with 5 μM FluoForte for 1 h at 37 °C in fresh Ca^{2+} -free BBS. FluoForte fluorescence was monitored every 2 s using a Zeiss 780 confocal microscope after thapsigargin injection (10 μM final). Relative mitochondrial calcium uptake was calculated by computing linear fits for 30 s after the maximum fluorescence intensity was reached.

Calcium uptake capacity of isolated zebrafish mitochondria. Extra-mitochondrial free Ca^{2+} was monitored in the presence of isolated mitochondria using Oregon Green 5N hexapotassium salt. Purified mitochondria from 75% epiboly embryos were resuspended in KCl medium (125 mM KCl, 2 mM K_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 and 20 mM HEPES, pH 7) containing 1 μM Oregon Green 5N (Molecular Probes) and supplemented with 5 mM glutamate and 5 mM malate. Oregon Green 5N fluorescence was measured using a Mithras LB 940 multimode microplate reader (Berthold Technologies) with excitation at 485 nm and emission at 510 nm. CaCl_2 (in supplemented KCl medium) was injected after 30 s of measurement at a final concentration of 20 μM .

Time-lapse microscopy. For cell tracing experiments, embryos co-injected with controlMO or *bclwv*MO and *lifecyclegfp* mRNA were manually dechorionated at the shield stage and incorporated into 0.5% low-melting point agarose. Before solidification, embryos were orientated in the dorsoventral plane to permit observation of the lateral mesoderm. Embryos were then observed using a Leica DMI4000 inverted microscope equipped with a 28 °C observation chamber, an EMCCD camera (Photometrics Quantem 512) and a $\times 40$ oil immersion objective. Time-lapse images were acquired every 20 s, and total acquisition time was 20 min. Image analyses were performed using ImageJ.

Transplantation. Embryos expressing β -actin-GFP were used as control donors, whereas *bclwv*MO was co-injected with rhodamine. Cells from control and morphant donors were removed at 50% epiboly and transplanted into the shield of the same WT receiver embryo at shield stage. Transplantation was verified under a fluorescence microscope. Cell migration in receiver embryos was analysed at 90% epiboly.

Statistical analyses. Error bars displayed on graphs represent the means \pm s.d. of three independent experiments. Statistical significance was analysed using Student's *t*-test. *P* < 0.01 was considered significant.

Co-localization percentage. Co-localization percentage between Flag-Bcl-wav and mitochondria labelled with MitoTracker was calculated with Zen software. Details regarding subcellular localization experiments are provided in Supplementary Methods.

References

1. Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Mol. Cell Biol.* **9**, 47–59 (2008).
2. Wang, C. & Youle, R. J. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 95–118 (2009).
3. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517–529 (2003).
4. Rizzuto, R. *et al.* Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 1342–1351 (2009).
5. Rappizzi, E. *et al.* Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca^{2+} microdomains to mitochondria. *J. Cell Biol.* **159**, 613–624 (2002).
6. De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabo, I. & Rizzuto, R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 336–340 (2011).
7. Baughman, J. M. *et al.* Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 341–345 (2011).
8. Bonneau, B., Prudent, J., Popgeorgiev, N. & Gillet, G. Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 1755–1765 (2013).
9. Eimon, P. M. & Ashkenazi, A. The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis. *Apoptosis* **15**, 331–349 (2010).
10. Sepich, D. S., Usmani, M., Pawlicki, S. & Solnica-Krezel, L. Wnt/PCP signaling controls intracellular position of MTOCs during gastrulation convergence and extension movements. *Development (Cambridge, England)* **138**, 543–552 (2011).
11. Kratz, E. *et al.* Functional characterization of the Bcl-2 gene family in the zebrafish. *Cell Death Differ.* **13**, 1631–1640 (2006).
12. Webb, S. E. & Miller, A. L. Calcium signalling during embryonic development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 539–551 (2003).
13. Arnaud, E. *et al.* The zebrafish bcl-2 homologue Nr2 controls development during somitogenesis and gastrulation via apoptosis-dependent and -independent mechanisms. *Cell Death Differ.* **13**, 1128–1137 (2006).
14. Popgeorgiev, N. *et al.* The apoptotic regulator Nr2 controls cytoskeletal dynamics via the regulation of Ca^{2+} trafficking in the zebrafish blastula. *Dev. Cell* **20**, 663–676 (2011).
15. Aouacheria, A., Rech de Laval, V., Deléage, G. & Combet, C. Characterization of the Bcl-2 family using structure-aided HMM Framework. *JOBIM* 79–80 (2010).
16. Kane, D. A. & Kimmel, C. B. The zebrafish midblastula transition. *Development* **119**, 447–456 (1993).
17. Gerety, S. S. & Wilkinson, D. G. Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. *Dev. Biol.* **350**, 279–289 (2011).
18. Tan, W. & Colombini, M. VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2510–2515 (2007).
19. De Stefani, D. *et al.* VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca^{2+} signals to mitochondria. *Cell Death Differ.* **19**, 267–273 (2012).
20. Roy, S. S. *et al.* Bad targets the permeability transition pore independent of Bax or Bak to switch between Ca^{2+} -dependent cell survival and death. *Mol. Cell* **33**, 377–388 (2009).
21. Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T. & Tsujimoto, Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 3100–3105 (2000).
22. Vander Heiden, M. G. *et al.* Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **276**, 19414–19419 (2001).
23. Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Schumacker, P. T. & Thompson, C. B. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell* **3**, 159–167 (1999).
24. Wallingford, J. B., Ewald, A. J., Harland, R. M. & Fraser, S. E. Calcium signaling during convergent extension in *Xenopus*. *Curr. Biol.* **11**, 652–661 (2001).
25. Markova, O. & Lenne, P. F. Calcium signaling in developing embryos: Focus on the regulation of cell shape changes and collective movements. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 298–307 (2012).
26. Gilland, E., Miller, A. L., Karplus, E., Baker, R. & Webb, S. E. Imaging of multicellular large-scale rhythmic calcium waves during zebrafish gastrulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 157–161 (1999).
27. Freisinger, C. M., Fisher, R. A. & Slusarski, D. C. Regulator of G protein signaling 3 modulates wnt5b calcium dynamics and somite patterning. *PLoS Genet.* **6**, 1001020 (2010).
28. Guillemain, Y. *et al.* Oocytes and early embryos selectively express the survival factor BCL2L10. *J. Mol. Med.* **87**, 923–940 (2009).
29. Guillemain, Y., Cornut-Thibaut, A., Gillet, G., Penin, F. & Aouacheria, A. Characterization of unique signature sequences in the divergent maternal protein Bcl2l10. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 3271–3283 (2011).

30. Rinckenberger, J. L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K. & Korsmeyer, S. J. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev.* **14**, 23–27 (2000).
31. Aouacheria, A., Brunet, F. & Gouy, M. Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 2395–2416 (2005).
32. Roy, S. S., Ehrlich, A. M., Craigen, W. J. & Hajnoczky, G. VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO Rep.* **10**, 1341–1347 (2009).
33. Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.* **7**, 1174–1181 (2000).
34. Tada, M., Concha, M. L. & Heisenberg, C. P. Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin. Cell Dev. Biol.* **13**, 251–260 (2002).
35. Zhu, S., Liu, L., Korzh, V., Gong, Z. & Low, B. C. RhoA acts downstream of Wnt5 and Wnt11 to regulate convergence and extension movements by involving effectors Rho kinase and diaphanous: use of zebrafish as an in vivo model for GTPase signaling. *Cell Signal* **18**, 359–372 (2006).
36. Kardash, E. *et al.* A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility in vivo. *Nat. Cell Biol.* **12**, 47–53 (2010).
37. Sheldahl, L. C. *et al.* Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J. Cell Biol.* **161**, 769–777 (2003).
38. Kohn, A. D. & Moon, R. T. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* **38**, 439–446 (2005).
39. Webb, S. E. & Miller, A. L. Ca²⁺ signalling and early embryonic patterning during zebrafish development. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 897–904 (2007).
40. Yin, C. & Solnica-Krezel, L. Convergence and extension movements mediate the specification and fate maintenance of zebrafish slow muscle precursors. *Dev. Biol.* **304**, 141–155 (2007).
41. Moradi-Ameli, M., Lorca, T., Ficheux, D., di Pietro, A. & Gillet, G. Interaction between the antiapoptotic protein Nr-13 and cytochrome c. Antagonistic effect of the BH3 domain of Bax. *Biochemistry* **41**, 8540–8550 (2002).
42. Gillet, G., Guerin, M., Trembleau, A. & Brun, G. A Bcl-2-related gene is activated in avian cells transformed by the Rous sarcoma virus. *EMBO J.* **14**, 1372–1381 (1995).
43. Thisse, C. & Thisse, B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.* **3**, 59–69 (2008).
44. Koppen, M., Fernandez, B. G., Carvalho, L., Jacinto, A. & Heisenberg, C. P. Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* **133**, 2671–2681 (2006).

Acknowledgements

We wish to thank the technical staff of the zebrafish and cell imaging facilities at Ecole Normale Supérieure de Lyon (Lyon Biosciences UMS 3444), and we thank Alexander Wood for reading the manuscript. This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de la Drôme). J.P. is supported by the Région Rhône Alpes and the Fondation pour la recherche Médicale. N.P. and B.B. are supported by the ARC and the Ministère de la Recherche.

Author contributions

J.P., N.P. and B.B. performed all experiments not otherwise attributed to other authors. J.P. and J.T. produced Bcl-wav protein and antibodies. J.P., J.L. and P.G. measured the oxygen consumption rate. S.M. performed the yeast experiments. B.B. and C.H. performed cell transplantation experiments. R.G. contributed to western blotting and co-immunoprecipitation assays. P.H. and R.R. contributed to the understanding of the *bclwv*MO phenotype. A.A. identified the *bclwv* sequence. J.P., N.P., B.B. and G.G. wrote the paper.

Additional information

Accession codes: Sequence data have been deposited in GenBank/EMBL/DBJ under accession number GU350411.1.

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

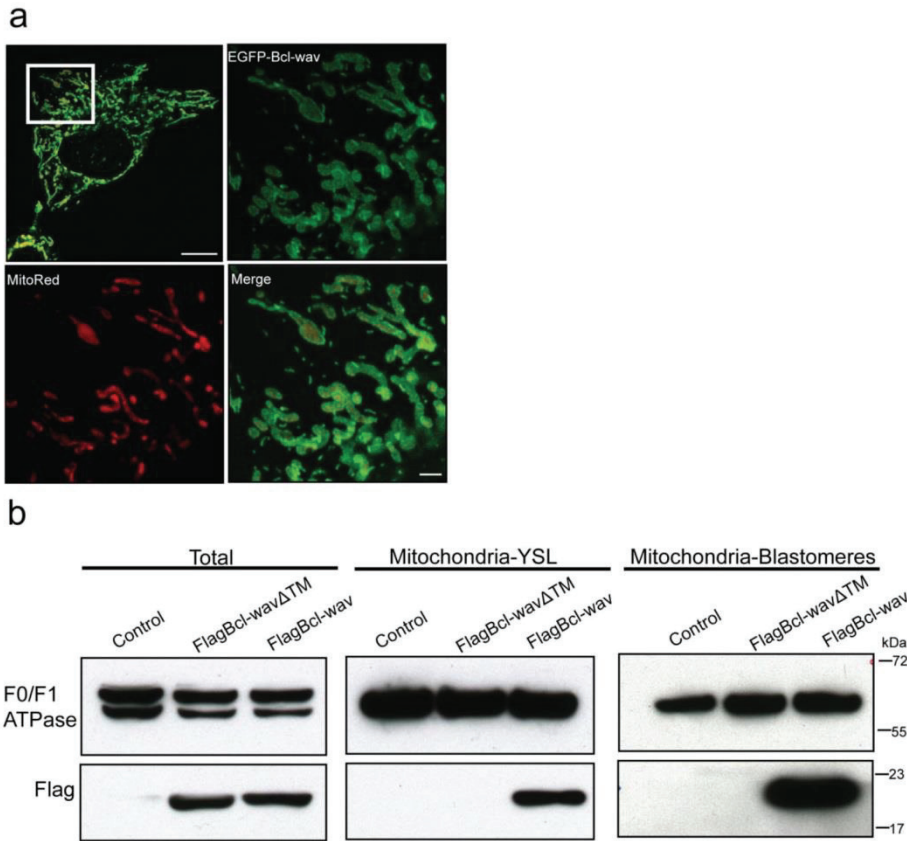
Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Prudent, J. *et al.* Bcl-wav and the mitochondrial calcium uniporter drive gastrula morphogenesis in zebrafish. *Nat. Commun.* **4**:2330 doi: 10.1038/ncomms3330 (2013).

Supplementary Information

Supplementary Figures

Supplementary Figure S1

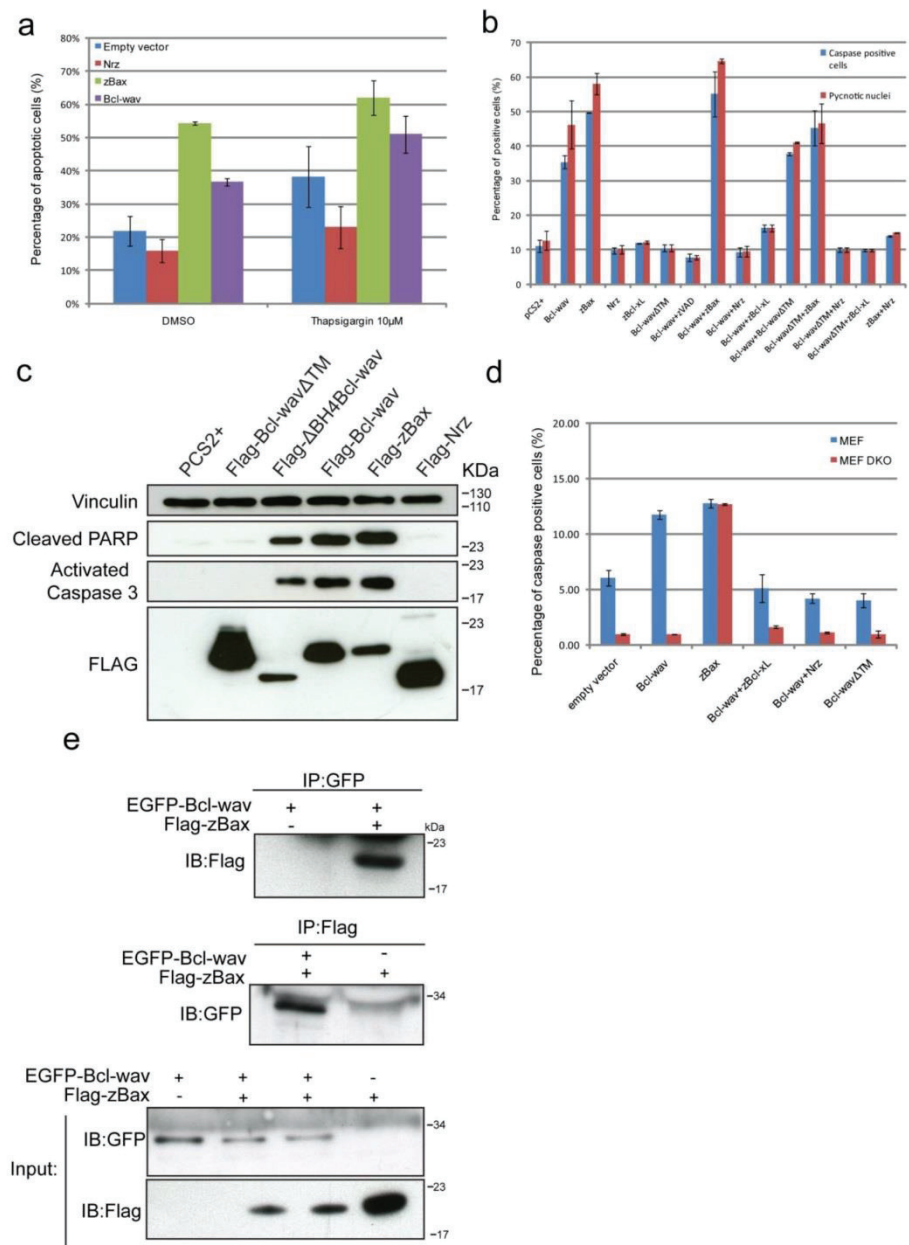


Supplementary Figure S1: Bcl-wav subcellular localization

(a) Flag-Bcl-wav is localized at the mitochondrial periphery. HeLa cells were transiently transfected with pEGFP-C1-Bcl-wav, expressing EGFP-Bcl-wav fusion protein, and with MitoRed to visualize mitochondria by confocal microscopy. White box represents the zoomed area. Scale bar in the upper left and lower right panels represent 2 μ m and 0.4 μ m respectively. **(b)** Localization of Flag-Bclwav and Flag-Bcl-wav Δ TM in zebrafish embryos. Total protein extracts as well as purified mitochondria from yolk syncytial layer (YSL) and

blastomeres were analyzed by immunoblot. In contrast to Flag-Bclw^{av}, Flag-Bcl-wav Δ TM did not localize to mitochondria. F0/F1 ATPase was used for calibration purposes.

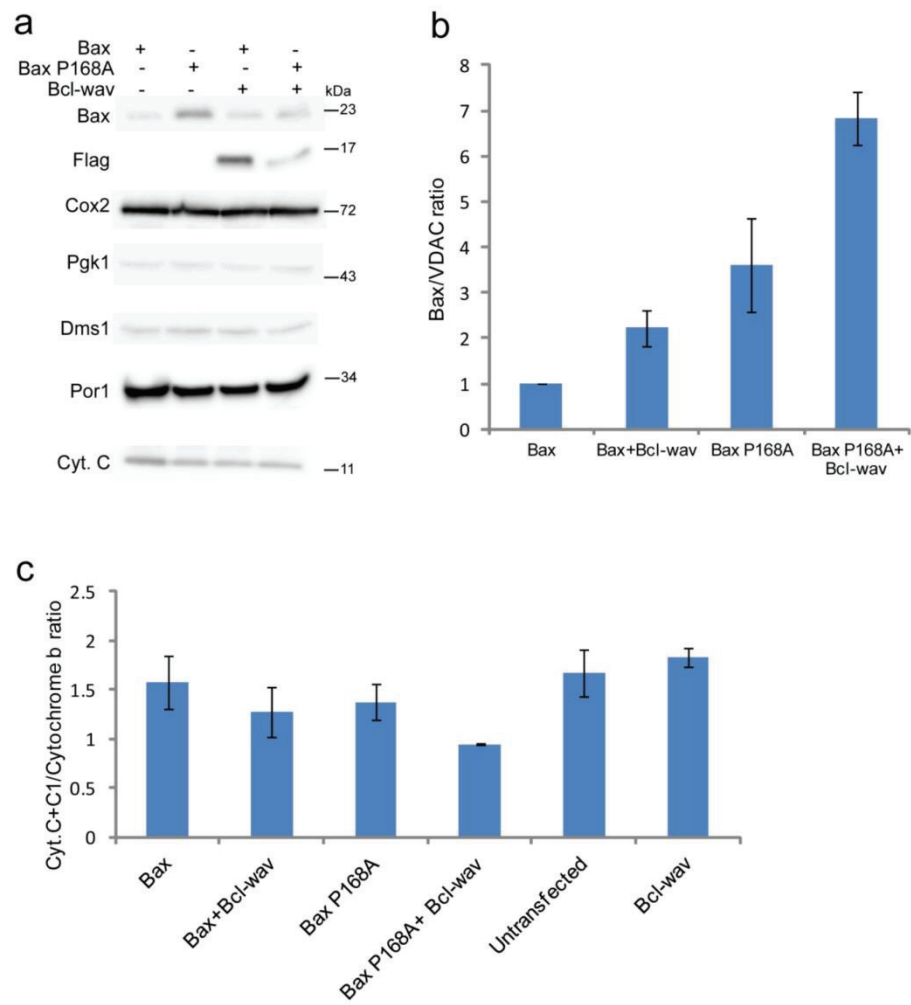
Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S2: Bcl-wav pro-apoptotic activity

(a) Bcl-wav promotes apoptosis in mammalian cells. HeLa cells were transiently transfected with the empty vector (pEGFP-C1) or different recombinant vectors (pEGFP-C1/Bcl-wav, zBax or Nrz) expressing EGFP, EGFP-Bcl-wav, EGFP-zBax and EGFP-Nrz fusion proteins respectively. Twenty-four hours post-transfection, cells were treated with the apoptosis inducer thapsigargin (10 μ M), or DMSO (negative control). Apoptosis was detected 24 hours post treatment by flow cytometry using the Annexin V (cy3) detection kit (mean \pm SD; three independent experiments). **(b)** Bcl-wav overexpression in HeLa cells induces caspase activation. Histograms showing the effect of Bcl-wav alone or co-transfected with zBax, Nrz or zBcl-xL. Apoptosis was measured by counting caspase positive cells and pycnotic nuclei (mean \pm SD; three independent experiments). Bcl-wav activity is inhibited by the apoptosis inhibitors Nrz and zBcl-xL. **(c)** Immunoblot showing Caspase 3 activation and PARP cleavage in HeLa cells transfected with pCS2+Flag-Bcl-wav and pCS2+Flag- Δ BH4Bcl-wav but not in control cells or pCS2+Flag-Bcl-wav Δ TM transfected cells. Immunoblotting was performed using anti-activated Caspase 3 and cleaved PARP antibodies; Vinculin was used for calibration. HeLa cells transfected with pCS2+Flag-zBax or pCS2+Nrz were used as positive or negative controls, respectively. **(d):** Bcl-wav pro-apoptotic activity is Bax/Bak dependent. Bcl-wav activity was analyzed using MEF and MEF DKO (*bax/bak* deficient) cells. Cell death was measured using the poly-caspase activation kit (mean \pm SD; three independent experiments). **(e)** Bcl-wav interacts with zBax *in cellulo*. Co-immunoprecipitation was performed with protein extracts from HeLa cells transfected with pEGFP-C1-Bcl-wav and pCS2+Flag-zBax, using anti-FLAG and anti-GFP antibodies.

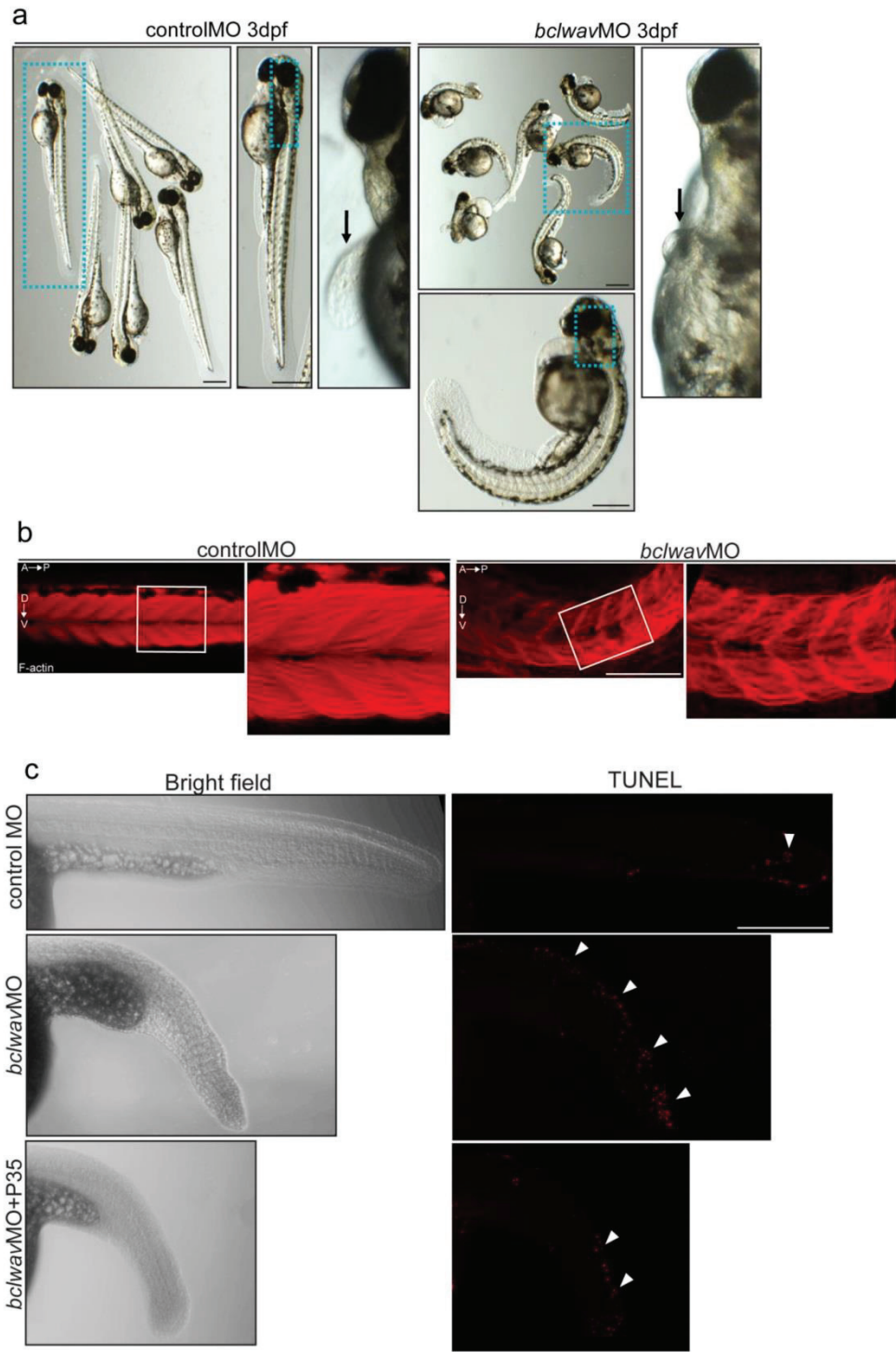
Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S3: Bcl-wav activates Bax and promotes cytochrome c release in yeast model

(a) Western-blots showing the mitochondrial content for different proteins in yeast strains expressing wild-type Bax (wt) or mutant Bax-P168A (PA) and expressing or not Bcl-wav. Cox2p (subunit 2 of cytochrome c oxidase) and por1p (mitochondrial porin) are markers of the inner and outer mitochondrial membranes, respectively. Markers of the cytosol and the endoplasmic reticulum were used to verify that the cross-contamination of mitochondrial fractions by these compartments was low and identical for the 4 strains (not shown). **(b)** Quantification of mitochondrial Bax in the different strains. Bax and VDAC were quantified with a Gbox analyzing system and data were expressed as the Bax/VDAC ratio (mean \pm SD; four to five independent experiments). **(c)** Mitochondrial cytochrome c was quantified by differential redox spectrophotometry. Mitochondria suspension (5mg/mL) was displayed in the two cuvettes of a dual-beam/dual wavelength spectrophotometer. The reference was oxidized with potassium ferricyanide and the sample was reduced with sodium dithionite. Cytochromes c+c1 and cytochrome b concentrations were calculated from the absorbance measurements at 550 *minus* 540 nm, and 561 *minus* 575 nm, respectively, with a molar extinction coefficient of 18.000 M⁻¹ cm⁻¹ for both (mean \pm SD; four independent experiments).

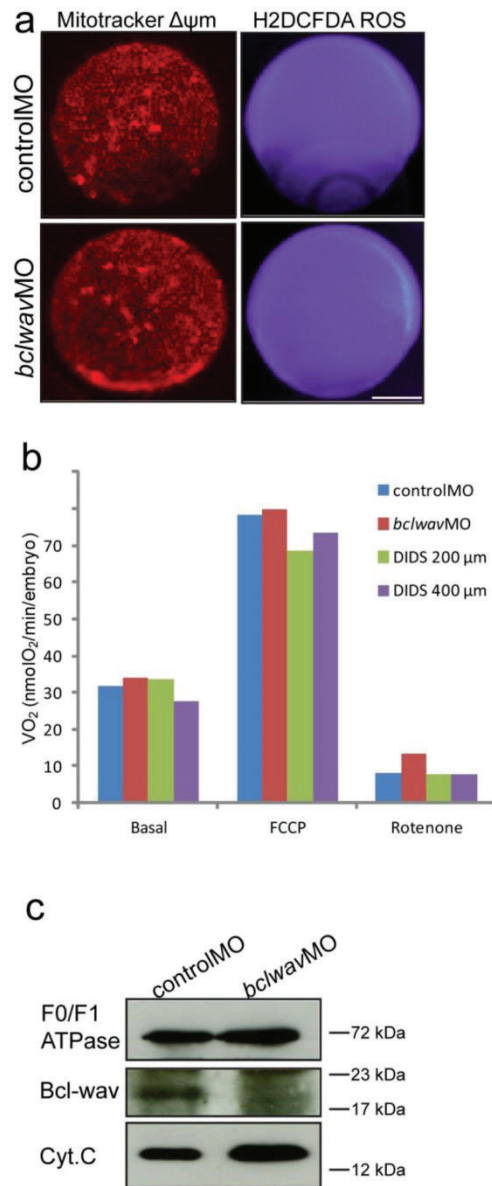
Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S4: Effect of *bclwav* knockdown on zebrafish development

(a) *Bclwav* knockdown phenotype at 3 days post fertilization. *Bclwav* morphant embryos exhibit a reduced and disturbed anteroposterior axis as well as a pectoral fin defect, compared to control embryos. (b) Phalloidin-rhodamine staining of 26 hpf embryos. In contrast to controls, *bclwav* morphant embryos show a severely disturbed F-actin network. (c) Cell death detection (TUNEL assay) in *bclwav* knockdown embryos. Cell death is detected at 26 hpf in controlMO or in *bclwav* morphant embryos injected or not with *p35* mRNA (white arrows). *Bclwav*MO injected embryos show a higher number of TUNEL positive cells compared to controlMO and to *bclwav*MO embryos co-injected with *p35* mRNA. Scale bar for all panels, 400 μ m.

Supplementary Figure S5

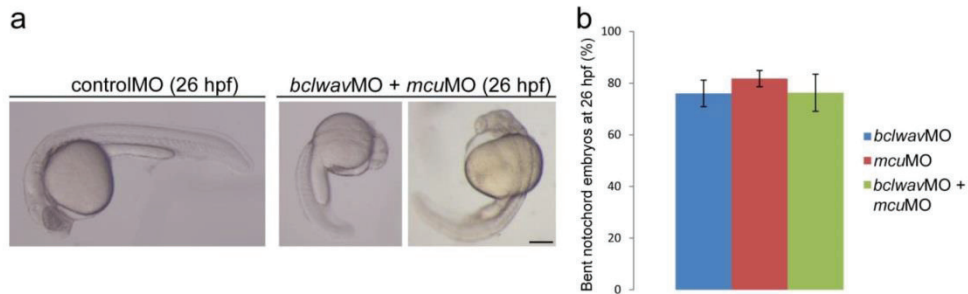


Supplementary Figure S5: Effect of *bclwav* knockdown on the mitochondrial physiology

(a) Mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) and ROS production measurement. Representative fluorescent microscopy images of Mitotracker™ Red-stained (left panel) and H₂DCFDA stained (right panel) embryos at the 75% epiboly stage. *Bclwav* morphants exhibit

no decrease in the labeling of mitochondria belt and no significant difference in ROS production compared to controlMO embryos. Scale bar, 200 μm . **(b)** Respiration rate of embryos at the 75% epiboly stage. Surprisingly, no significant difference in oxygen consumption is observed between *bclwav*MO, DIDS (VDAC inhibitor) treated embryos and controlMO embryos. Addition of FCCP has no significant effect on maximum oxygen consumption. Complete inhibition of respiratory chain complex I (rotenone) decreases oxygen consumption rate in all conditions. Results of two independent experiments. **(c)** Immunoblot analysis of Bcl-wav protein and cytochrome c content of purified mitochondria at the 75% epiboly stage; F0/F1 ATPase was used as a loading control. *Bclwav* silencing does not induce cytochrome c release.

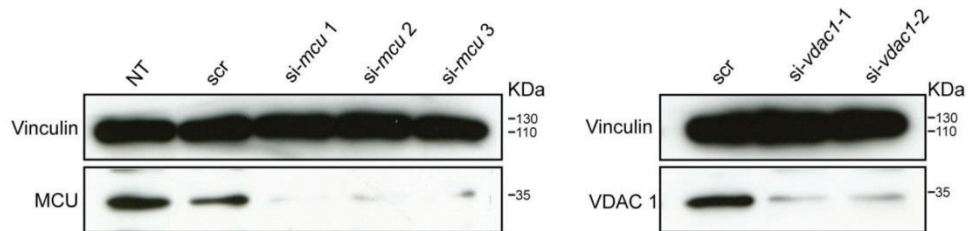
Supplementary figure S6



Supplementary Figure S6: Effect of *bclwav* and *mcu* knockdown on notochord formation

(a) Representative bright field images of double *bclwav* plus *mcu* morphant embryos at 26 hpf showing the typical bent notochord phenotype compared to controlMO embryos. This concurrent silencing does not lead to additional developmental defects detectable at macroscopic level. Scale bar, 400 μ m. **(b)** Histogram showing the percentage of bent notochord phenotype, at 26 hpf, resulting from *bclwav*MO or *mcu*MO injected alone or in combination. Double morphant embryos do not present percentage increase in the bent notochord phenotype compared to single ones (mean \pm SD; three independent experiments).

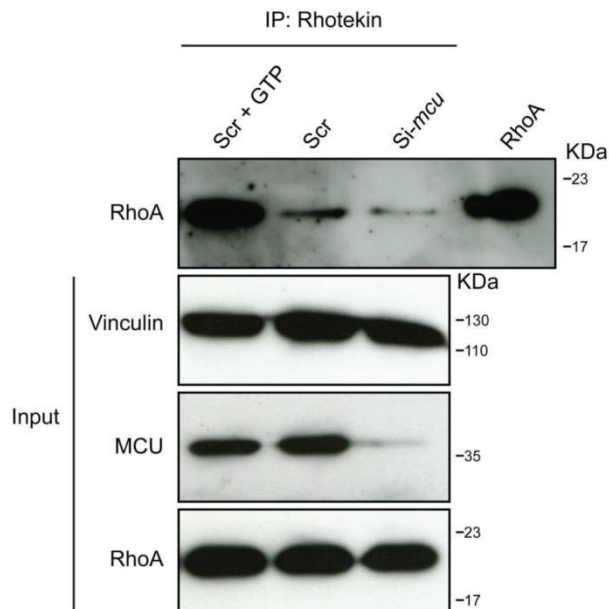
Supplementary figure S7



Supplementary Figure S7: Efficiency of the si-*mcu* and si-*vdac1* used in this study

Analysis of the efficiency of three *mcu* siRNAs (si-*mcu* 1-3) and two *vdac1* siRNAs (si-*vdac1* 1, 2) in HeLa cells. Lysates from cells transfected with scrambled (scr-), si-*mcu* and si-*vdac1* siRNAs were analyzed by immunoblot with an anti-MCU (left panel) and anti-VDAC1 (right panel) antibodies. Vinculin was used as lysates load control.

Supplementary figure S8



Supplementary Figure S8: *Mcu* knockdown leads to decreased RhoA activation

Analysis of the small GTPase RhoA activation in *mcu* silenced (si-*mcu*) cells by pull-down experiment. In si-*mcu* cells, the activation of RhoA is decreased compared to control cells. GTP γ S was used for positive control of the pull-down experiment. Recombinant RhoA protein was used as positive control.

Supplementary figure S9

Figure 2 c

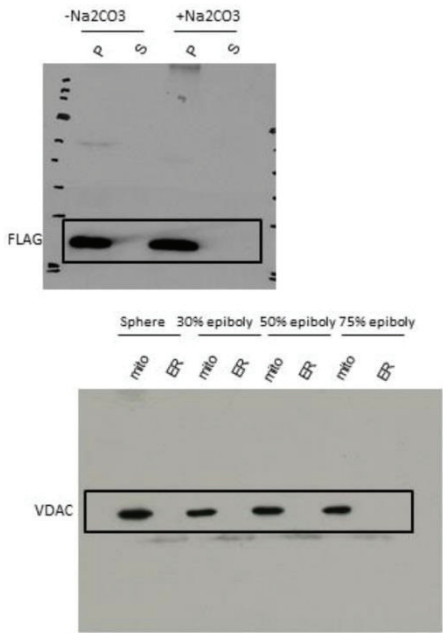


Figure 2 d

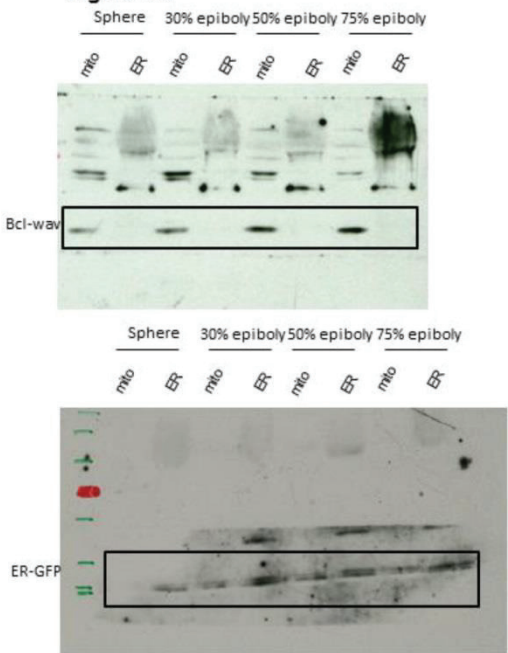
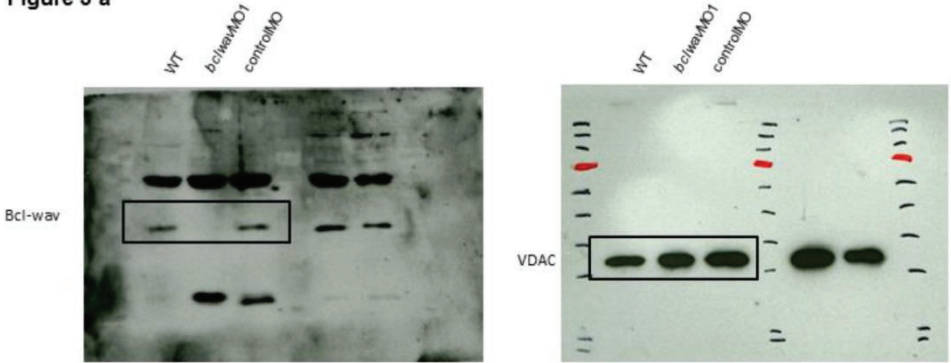
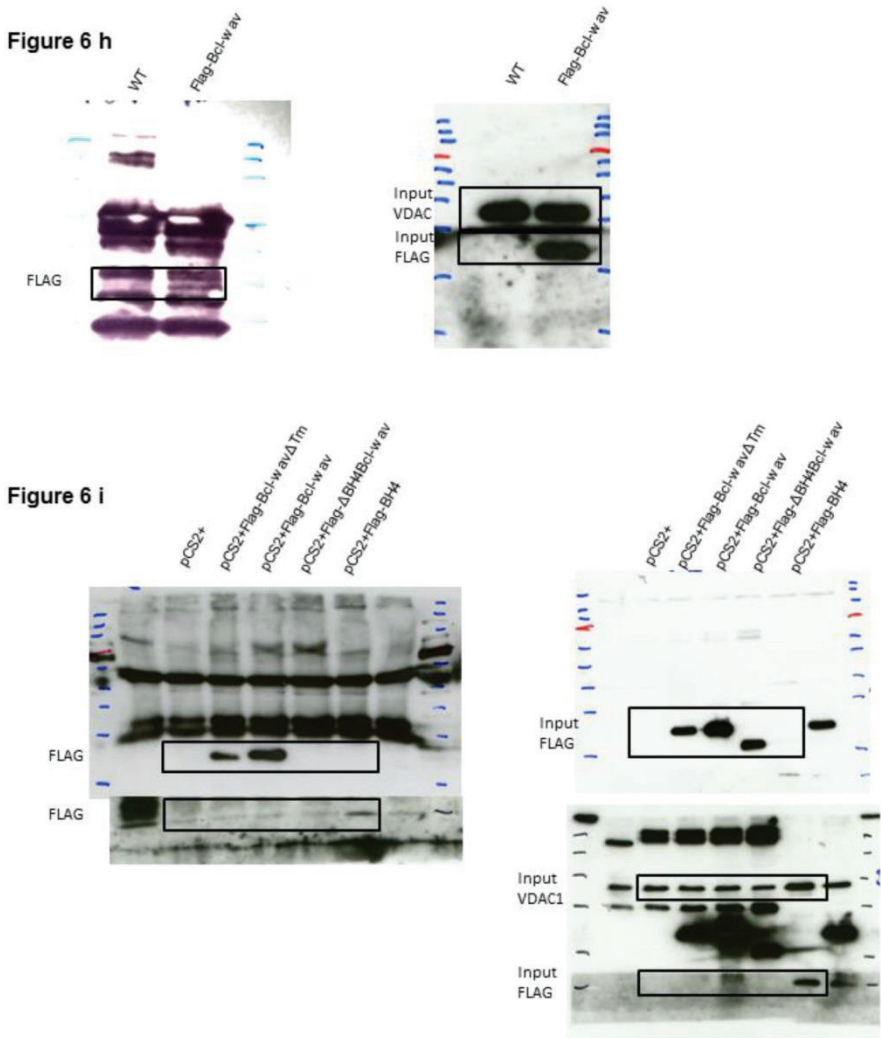


Figure 3 a



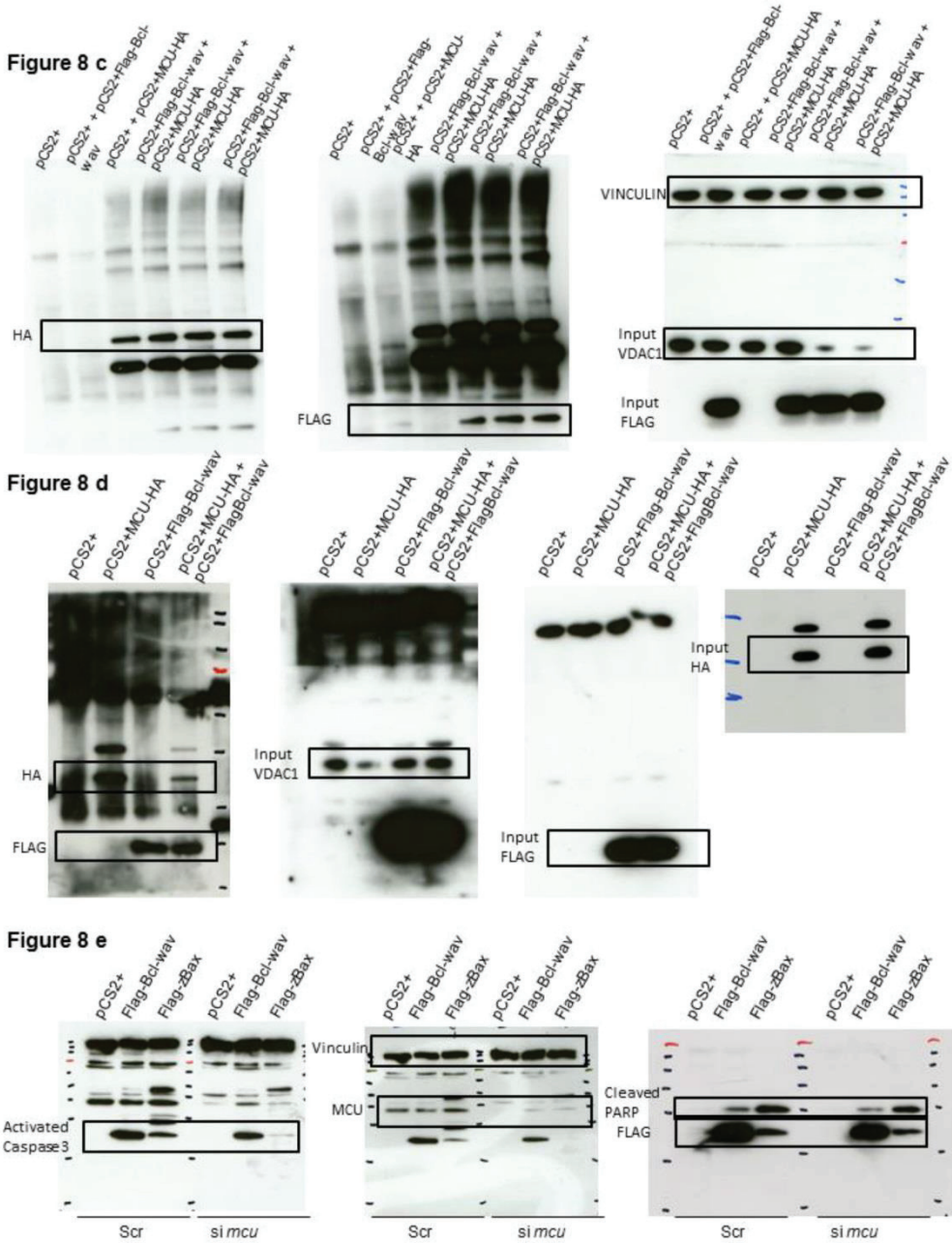
Supplementary Figure S9: Full scans of Western Blots from figures 2 and 3

Supplementary figure S10



Supplementary Figure S10: Full scans of Western Blots from figure 6

Supplementary figure S11



Supplementary Figure S11: Full scans of Western blots from figure 8

Supplementary Tables

Vectors	Constructs	oligonucleotides primers
pCS2+	Flag- <i>bclwav</i>	5'- ATATGAATTCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGGGACGGT CAGACGACGC-3'
		5'- ATATCTCGAGCTAGGTTTTTCTTCTTGCCATATGAAATAGGATAAGA-3'
	Flag- <i>bclwav-5mut</i>	5'- ATATGAATTCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGGG <u>CCGAT</u> CAGATGACGCGGTAA-3'
		5'- ATATCTCGAGCTAGGTTTTTCTTCTTGCCATATGAAATAGGATAAGA-3'
	Flag- <i>bclwav</i> ΔTm	5'- ATATGAATTCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGGGACGGT CAGACGACGC-3'
		5'- ATATCTCGAGCTAGGTTTTTCTTCTTGCCATATGAAATAGGATAAGA-3'
	Flag-Δ <i>BH4 bclwav</i>	5'- ATATGAATTCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCCGTTGTGTCC GGCACCTTCCC-3'
		5'- ATATCTCGAGCTAGGTTTTTCTTCTTGCCATATGAAATAGGATAAGA -3'
	Flag- <i>BH4 bclwav</i>	5'- ATATGAATTCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGGGACGGT CAGACGACGC-3'
		5'- ATATCTCGAGCTAGACGCTGGTTTGGCTGTCACGTAGCT-3'
	<i>Bclwav</i> ¹⁻²⁹³	5'- ATATGAATTCATGGGACGGTCAGACGACGCTGTGATTG-3'
		5'- ATATCTCGAGGCGCCTCGTGGGAGCGAAGTGTTTCG-3'
	<i>Bclwav</i> ³⁰⁰⁻⁶⁰⁰	5'- ATATGAATTCATGGCCTGGAGCGCCGTGCTGTCG-3'
		5'- ATATCTCGAGCTAGGTTTTTCTTCTTGCCATATGAAATAGGATAAGA-3'
pCS2+-EGFP	<i>zvdac1</i> -HA	5'- ATATATCGATATGGCTGTTCCTCCACATATGTGGAT-3'
		5'-ATATGAATTCTCAAGCATAATCAGGAACATCATAAGGATATGCCTCAA ACTCCAGACCCA-3'
	<i>hvdac1</i> -HA	5'- ATATATCGATATGGCTGTGCCACCCACGTATCGGC-3'
		5'- ATATCTCGAGTTAAGCATAATCAGGAACATCATAAGGATACATTGCTT GAAATTCCAGTCCTAGACCAAG-3'
	<i>hmcu</i> -HA	5'- ATATGAATTCATGGCGGCCGCCGACGGTAGATCGCTC-3'
		5'- ATATCTCGAGTCAAGCATAATCAGGAACATCATAAGGATACATATCTT TTTCACCAATTTGTCGGAG-3'
pT7-7-6HIS	<i>Bclwav</i> ΔTm	5'- AATTCATGGGGGTTGCAGATCTTATTAAGAAGTTCTGAATCTATCTCTAA GGAAGAGGGG-3'
		5'- GATCCCCCTCTTCCTTAGAGATAGATTCTGAACCTCTTAATAAGATCTGCA ACCCCCATG-3'
pEGFP-C1	<i>Bclwav</i>	5'- ATATCATATGGGACGGTCAGACGACGCTGTG-3'
		5'- ATATCTGCAGACACACCTTTACCACATGGTCTTC -3'
pEGFP-C1	<i>Bclwav</i>	5'- ATATGTCGACATGGGACGGTCAGACGACGC -3'
		5'- ATATGGATCCCTAGGTTTTTCTTCTTGCCATATGAAATAGGATAAGA -3'

Supplementary Table S1 : Sequence of oligonucleotide primers used for this study

Supplementary Methods

RNA extraction and *bclwav* cloning

For *bclwav* expression and cloning, zebrafish embryos before the mid-blastula transition (MBT) were used. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Poly A⁺ RNA was purified from total RNA extracted using the Oligotex[®] mRNA kit (QIAGEN) and was then treated with DNase (Turbo DNA-free, Ambion). Complementary DNA was generated with a cDNA synthesis kit (iScript cDNA synthesis kit, Biorad) using 450 ng of Poly A⁺ RNA. The *bclwav* gene was amplified by PCR using a High Fidelity PCR System (Roche), following the manufacturer's instructions with appropriate primers: forward (fwd): 5'- GAATTCATGGGACGGTCAGACGACGC-3' and reverse (rev): 5'- CTCGAGCTAGGTTTTTCTTCTTGTCATATGAAATAGGATAAGA-3'. The cDNA of Bcl-wav and its mutants were synthesized using PCR-based strategies and appropriate primers (see Supplementary Table S1). The various PCR products were *EcoRI/XhoI*, *SalI/BamHI* and *NdeI/PstI* double-digested and subcloned into the pCS2+, pEGFP-C1 and pT7-7 6-His vectors, respectively.

The Lifeact sequence was obtained from Riedl et al., 2008⁴⁵.

Cell culture and transfection

HeLa, MEFs and DKO MEFs cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. For transient transfection, cells were transfected using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. For small interfering (si) RNA experiments, cells were transfected using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) with 5 nM siRNA. A control si RNA scrambled All star negative is used for each experiment. To silence *mcu* and *vdac1*, we used the following si RNA from Integrated DNA Technologies

targeting the 3'UTR region: si-mcu 1: (HSC.RNAI.N138357.12.5) 5'-GGAUCUCAAGGGUGCAAUUUAUCU-3', si-mcu 2: (HSC.RNAI.N138357.12.9) 5'-GGAACCAACUUAUAACUGUUUAAUA, si-mcu 3: (HSC.RNAI.N138357.12.3) 5'-GCAAUGUACCUUCUGGAACAAUAAA-3'; si-*vdac1*-1: (HSC.RNAI.N003374.12.3) 5'-GCACCAGAGUAUGAAAUAGCUUCCA-3', si-*vdac1*-2: (HSC.RNAI.N003374.12.4) 5'-GCAAGUGGAAGCGGAUAAUAUGUAG-3'.

Subcellular localization of Bcl-wav

Bcl-wav protein localization was performed in HeLa cells transiently transfected with pCS2+Flag-Bcl-wav, pCS2+Flag-Bcl-wav Δ Tm and pCS2+Flag- Δ BH4Bcl-wav. Twenty-four hours later, mitochondria were labeled with 100 nM MitotrackerTM Red CMXRos. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at 37°C, washed three times in PBS and Mitotracker was washed away using glacial acetone for 20 min. Cells were then permeabilized for 20 min at RT with PBS 0.1% Triton X-100, 3% BSA, 1 mg/mL RNase A and then incubated with 1/500 anti-Flag M2 antibody for 1 hour at RT. Cells were washed three times in PBS – 0.1% Triton X-100, and incubated with Alexa Fluor secondary antibody. Cells were then mounted on a cover slip and analyzed using a LSM510 confocal microscope (Zeiss).

***In vitro* assay for mitochondrial Bcl-wav insertion**

All steps were carried out at 4°C if not otherwise stated. Twenty-four hours after transient transfection with pCS2+ (empty vector) or pCS2+Flag-Bcl-wav in HeLa cells, mitochondria were purified as described above. In brief, cells were re-suspended in MB buffer, and mechanically broken fifty times using a 26 G x 23 needle fitted on a 1 mL syringe. Homogenates were cleared at 1500 x g and mitochondria were spun down at 10,600 x g. Protein concentrations were measured with Bradford assay and processed for Bcl-wav

insertion analysis. Mitochondria (25 µg) were re-suspended in 100 µl of freshly made Na₂CO₃ buffer (0.1 M, pH 11) or in MB buffer; they were then incubated in ice for 30 min and centrifuged at 100,000 × *g* for 30 min. Pellets and supernatants were analyzed by immunoblotting.

Yeast experiments

Synthetic cDNA encoding Bcl-wav and Bax with an optimized yeast codon bias (Eurogentec) was cloned in pYES2 and pYES3 plasmids (Invitrogen) in frame with a NH₂-terminal FLAG epitope. Both plasmids allow the expression of *bclwav* or *bax* under the control of the yeast inducible promoter GAL1/10, and carry auxotrophic markers URA3 and TRP1, for pYES2 and pYES23, respectively. The haploid wild-type strain W303-1B (mat a, ade1, his3, leu2, trp1, ura3), transformed with the plasmids of interest, was grown in SD medium (Difco) supplemented with 2% DL-lactate for an optimal differentiation of the mitochondria. When the cell concentration reached 0.5x10⁷ cells/mL, 0.5% galactose was added to induce *bax/bclwav* expression. Growth was prolonged overnight (14 hours). Mitochondria were isolated from zymolyase-treated cells and analyzed by western-blotting. Blots were quantified with a gel imaging system (Gbox, Syngene). Mitochondrial cytochrome c content was quantified by differential redox spectrophotometry with a dual beam/dual wavelength spectrophotometer.

RhoA activation assay

To measure endogenous small GTPase activity, RhoA/Rac1/Cdc42 activation assay combo kit was used (Cell Biolabs Inc., San Diego). Briefly, cells transfected or not with the si-*mcu* were lysed on ice in Assay/Lysis Buffer 1X for 15 min. Cell lysates were centrifuged for 15 min (14,000 × *g* at 4 °C), and the supernatant was incubated with the Rhotekin RBD or PAK PBD-agarose beads at 4 °C for 1 h on a rotator. Beads were washed three times with 0.5 ml of

Assay Buffer 1X. Protein samples were eluted with 2× SDS-PAGE sample buffer and processed for Western blotting with anti-RhoA antibody (Cell Biolabs, 1:6,000).

Measurement of oxygen consumption rate

The respiratory activity of embryos was measured with the Oxygraph-2k 2 mL respirometer (Oroboros instrument), which used a Clark-type electrode in a magnetically stirred all-glass reaction chamber. After equilibration and heating to 25°C and calibration as per the manufacturer's protocol, the background oxygen consumption by the sensor in 2 mL of egg water was measured. Then, 50 embryos per condition were added and oxygen consumption was analyzed. When oxygen consumption was stable, 5 µl of FCCP (4 mM) was added and experiment was achieved by 10 µl of rotenone (0.5 mM).

Plasmids and antibodies

pET21b-P35 was purchased from Addgene, pEGFP-C1 was obtained from Clontech and pCS2+*notail* and pCS2+*col2.1a* were gifts from Dr T. Lepage and Dr D. Baas, respectively.

Chemical reagents, anti-alpha tubulin mouse monoclonal DM1A (T9026, 1:1,000) antibody, anti-Flag M2 mouse monoclonal antibody (F3165, 1:1,000), anti-MCU polyclonal antibody (HPA016480, 1:100) and anti-vinculin mouse monoclonal Clone VIN-11-5 (V4505, 1:1,000) antibody were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-Bax total rabbit polyclonal antibody (ab 16837, 1:200), anti-VDAC/PORIN rabbit polyclonal antibody (ab 34726, 1:500), anti-VDAC1 mouse monoclonal antibody (ab 14734, 1:1,000), anti-cleaved-PARP polyclonal antibody (ab 6079, 1:500) and anti-HA tag (ab 13834, 1:500) were purchased from Abcam. Anti-HA.11 tag mouse monoclonal antibody (16B12, 1:1,000) was purchased from Covance. Anti-Bax (N-20) rabbit polyclonal antibody (SC-493, 1:200) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, anti-activated Caspase-3 antibody (no. 559565, 1:1,000) from BD Biosciences, anti-GFP rabbit polyclonal antibody (A11122, 1:1,000) from Invitrogen.

HRP-conjugated goat anti-mouse, rabbit anti-mouse and goat anti-rabbit secondary antibodies (Roche, 1:3000) were used as secondary antibodies. Western blot analysis was performed according to standard procedures.

For immunofluorescence, goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (green fluorescent) or 568 (red fluorescent) were used as secondary antibodies (Molecular Probes, 1:2,000).

Fluorescent dyes were purchased from Molecular Probes (Invitrogen).

Supplementary references

- 45 Riedl, J. *et al.* Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* **5**, 605-607 (2008).

***DISCUSSION ET
PERSPECTIVES***

✓ Nrz se localise au RE et à la mitochondrie

Comme de nombreux membres de la famille Bcl-2, Nrz possède à son extrémité C-terminale un domaine transmembranaire. Ce domaine est essentiel pour la localisation de ces protéines dans les membranes cellulaires dont celles du RE ou de la mitochondrie. La protéine Nrz exprimée de façon transitoire en cellules se localise à la fois à la mitochondrie et au RE. Il semblait donc probable que Nrz se localise également dans ces organites *in vivo*. Cependant, la présence de mitochondries et de RE dans le YSL n'avait pas été décrite jusqu'à présent. Par différentes approches nous avons pu montrer que cette couche cellulaire contient bien des mitochondries et du RE qui sont probablement relargués dans le vitellus de la même façon que les noyaux lors de la formation du YSL.

Par fractionnement subcellulaire nous avons pu montrer que Nrz se localise bien au RE et à la mitochondrie dans le YSL. De façon intéressante, le profil de localisation de Nrz ne semble pas être modifié au cours de la progression de l'épibolie suggérant que cette double localisation est un attribut par défaut de Nrz. Cependant, nous n'avons pas pu établir la façon dont le ratio RE/mitochondrie est déterminé. Il est probable qu'il existe, en plus du domaine d'ancrage C-terminal, des éléments de structure primaire permettant d'assurer la localisation de Nrz dans ces deux compartiments. Le domaine BH4 semble ainsi jouer un rôle déterminant dans la localisation de Nrz au RE. En effet, l'expression du domaine BH4 seul dans des embryons de poisson zèbre s'accompagne d'un phénotype similaire à celui observé lors de l'inactivation de *nrz* (observations non publiées) suggérant que le domaine BH4 seul est capable d'interagir avec l'IP₃R et probablement d'entrer en compétition avec Nrz pour la fixation sur le récepteur. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la surexpression conjointe de Nrz et du domaine BH4 en cellules diminue l'interaction entre la protéine entière et l'IP₃R. Ainsi, la séquence du domaine BH4 pourrait constituer un signal pour l'interaction avec l'IP₃R et donc pour la localisation de Nrz au RE. Cependant, le domaine transmembranaire doit également jouer un rôle important puisque le mutant de délétion Nrz Δ TM dépourvu de son TM possède une localisation cytosolique ; ce mutant n'est par ailleurs pas capable de prévenir le phénotype induit par l'inactivation de *nrz* suggérant qu'il n'est pas à même de réguler l'activité de l'IP₃R. Ainsi, les domaines BH4 et TM pourraient tous deux constituer des signaux de localisation pour Nrz. L'étude de la localisation de protéines chimères BH4-GFP et GFP-TM pourrait nous renseigner sur la contribution de ces domaines à la localisation mitochondriale et/ou réticulaire de Nrz. La protéine Nrz pourrait de plus interagir avec des protéines régulant sa localisation comme cela a été décrit pour Bcl-2.

En effet, Bcl-2 semble interagir avec la protéine FKBP38 ce qui pourrait favoriser sa localisation mitochondriale (Shirane and Nakayama, 2003).

✓ Rôle de Nrz au niveau de la mitochondrie

À l'instar des autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, l'une des fonctions de Nrz à la mitochondrie est d'inhiber la formation de pores par Bax. Cependant, Nrz semble également jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique mitochondriale. Lors de l'inactivation de *nrz* chez le poisson zèbre nous avons pu observer une perte du potentiel transmembranaire des mitochondries du YSL couplé à un relargage de cytochrome c. Ces altérations sont très probablement dues à une surcharge de calcium dans la mitochondrie consécutive à l'augmentation de calcium dans le cytosol. En effet, un mutant de Nrz localisé uniquement à la mitochondrie (NrzMaoB) prévient ces dysfonctionnements de la mitochondrie en amplifiant en même temps l'augmentation de calcium cytosolique dans les embryons invalidés pour *nrz*, ce qui suggère fortement que Nrz est capable de moduler l'entrée de calcium dans la mitochondrie.

De plus des expériences réalisées au laboratoire indiquent que Nrz est capable d'interagir avec VDAC et nous avons également observé que la surexpression de Nrz diminue le repompage de calcium par les mitochondries dans des cellules en culture (observations non publiées). Ainsi, Nrz semble également jouer un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie calcique mitochondriale bien que des expériences plus approfondies soient encore nécessaires pour comprendre l'implication de Nrz dans ce processus. Finalement, le fait que Nrz interagisse à la fois avec l'IP₃R et avec VDAC suggère que Nrz pourrait être spécialisée dans le contrôle du transit de calcium entre la mitochondrie et le RE. À cet égard, il pourrait être intéressant d'étudier si Nrz ne s'accumule pas préférentiellement dans les MAM qui sont justement des domaines jouant un rôle essentiel dans le transfert de calcium du RE à la mitochondrie et où l'IP₃R et VDAC sont physiquement liés.

✓ Régulation de l'IP₃R par Nrz

Au niveau du RE, Nrz est donc capable d'interagir avec l'IP₃R et de réguler négativement son activité. Comme nous l'avons vu en introduction, d'autres protéines de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2 et Bcl-xL interagissent avec l'IP₃R. De manière intéressante ces protéines ne semblent pas partager le même site d'interaction sur le récepteur. Ainsi, Bcl-2 interagit plutôt

avec le domaine central de modulation alors que Bcl-xL s'associe préférentiellement au domaine C-terminal de couplage (Monaco et al., 2012a). Cette différence a été attribuée à des résidus clés dans le domaine BH4. Ainsi, Bcl-2 posséderait un résidu lysine dans son domaine BH4, qui est absent de celui de Bcl-xL, et qui serait responsable de l'interaction avec le domaine de modulation (Monaco et al., 2012b). Concernant la protéine Nrz, nous avons montré qu'elle interagit avec le domaine de liaison de l'IP₃, décrivant ainsi un nouveau site d'interaction entre les protéines de la famille Bcl-2 et l'IP₃R. Par une approche bio-informatique nous avons pu identifier un résidu cystéine dans le domaine BH4 qui pourrait être responsable de cette interaction. De façon surprenante, ce résidu cystéine est conservé dans tous les orthologues de Nrz à l'exception des oiseaux. Des expériences préliminaires menées au laboratoire semblent d'ailleurs indiquer que Bcl2l10 (orthologue humain) est bien capable d'interagir avec le domaine de liaison de l'IP₃ alors que Nr-13 (orthologue chez le poulet) ne semble pas partager cette propriété (observations non publiées). L'origine évolutive de cette différence reste inconnue mais étant donné le rôle de Nrz dans le développement, on peut supposer que la géométrie de l'embryon, sphérique chez les poissons et les mammifères, plat chez les oiseaux, pourrait déterminer le mécanisme de régulation de l'IP₃R par les orthologues de Nrz. Ces résultats suggèrent donc que cette cystéine pourrait être un élément clé de l'interaction entre Nrz et le site de liaison de l'IP₃. Ainsi il apparaît que la présence de résidus clés dans le domaine BH4 des protéines de la famille Bcl-2 pourrait être un signal déterminant leur site d'interaction avec l'IP₃R et donc leur mode de régulation de ce récepteur.

De plus, l'interaction de Nrz avec ce domaine de l'IP₃R suggère que Nrz peut modifier la fixation de l'IP₃ sur son récepteur. En effet, jusqu'à présent, la seule protéine décrite comme interagissant avec le domaine de liaison de l'IP₃ est IRBIT (Ando et al., 2003, 2006). Celle-ci inhibe la fixation du ligand sur l'IP₃R en interagissant avec son site de liaison. Cependant, Nrz semble utiliser un mécanisme différent puisqu'elle n'interagit pas avec les résidus impliqués dans la fixation de l'IP₃. En effet, nos résultats indiquent que Nrz interagit à l'extérieur de la poche de liaison de l'IP₃. Pour étudier, l'effet de Nrz sur la fixation de l'IP₃ nous avons choisi d'utiliser un système basé sur le changement de conformation du domaine de liaison induit par la fixation de l'IP₃. Cette approche permet des mesures *in cellulo* et rend compte d'une situation plus « physiologique » notamment au niveau des concentrations d'IP₃ en jeu. Cependant, les résultats que nous avons obtenus ne permettent pas d'exclure que Nrz plutôt que de modifier la fixation du ligand perturbe en fait le changement de conformation du domaine de liaison. En revanche, nous avons initié des mesures directes de fixation de l'IP₃

sur une forme recombinante du domaine de liaison de l'IP₃ et il semble que Nrz soit bien capable de modifier la fixation de l'IP₃ sur son site de liaison *in vitro* (observations non publiées). Au total nos résultats indiquent que Nrz exercerait son effet répresseur sur l'IP₃R en inhibant la fixation de l'IP₃ sur son récepteur.

Le mécanisme permettant à Nrz d'exercer une telle inhibition reste encore à déterminer. Au vu de nos résultats une hypothèse peut toutefois être formulée. En effet, d'après notre étude de docking, Nrz semble interagir à l'extérieur de la poche de fixation de l'IP₃. De plus nous avons pu montrer que les trois premiers domaines de Nrz sont importants pour son activité au RE bien que le seul domaine BH4 soit suffisant pour l'interaction avec l'IP₃R. Ainsi, il est possible qu'après fixation sur l'IP₃R *via* son domaine BH4, Nrz crée un encombrement à l'entrée du site de fixation de IP₃ et en diminue l'accessibilité. Il serait intéressant de tester cette hypothèse en étudiant par exemple l'effet sur la fixation de l'IP₃ d'une protéine chimère contenant le domaine BH4 de Nrz couplé à d'un domaine « stériquement encombrant ».

✓ **Phosphorylation de Nrz**

Par la suite, nous avons également pu montrer que la phosphorylation de Nrz modifie son interaction avec l'IP₃R. Par des études de mutagenèse nous avons pu déterminer qu'au moins deux résidus sérine situés dans la boucle entre les domaines BH4 et BH3, contribueraient à la régulation de cette interaction. Cependant, nous n'avons pu encore identifier la ou les kinases responsable(s) de cette modification. Comme décrit dans l'introduction, Bcl-2 est également phosphorylée sur une boucle similaire et l'on peut donc imaginer que certaines kinases phosphorylant Bcl-2 pourraient également phosphoryler Nrz.

Parmi ces kinases, la PKC est un candidat tout particulièrement intéressant. En effet, la PKC est activée par le DAG qui est produit en même temps que l'IP₃ lors de l'hydrolyse du PIP₂. Ainsi, lors de la synthèse d'IP₃, l'activation de la PKC pourrait permettre la phosphorylation de Nrz afin de rompre son interaction avec l'IP₃R et ainsi faciliter l'accès de l'IP₃ à son site de liaison. Il est par ailleurs connu que la PKC phosphoryle l'IP₃R ce qui l'active (Voir introduction partie 2.5.8.3). Ainsi, lors de la synthèse d'IP₃, la PKC activée pourrait phosphoryler conjointement Nrz et l'IP₃R pour assurer une sortie rapide de calcium du RE et la génération de vagues de calcium dans le YSL. Cependant, comme une élévation excessive de calcium risque fort d'être fatale pour l'embryon, ces vagues de calcium se doivent d'être finement régulées et par conséquent Nrz doit très certainement être rapidement déphosphorylée afin d'éviter la fixation constitutive de l'IP₃ sur son récepteur. Ainsi, on peut

supposer que l'élévation de calcium est susceptible d'activer une phosphatase calcium-dépendante telle que la calcineurine. De façon intéressante, Bcl-2 interagit avec la calcineurine (Shibasaki et al., 1997) et cette dernière semble déphosphoryler de façon spécifique les résidus de l'IP₃R phosphorylés par la PKC (Cameron et al., 1995). Ainsi, une boucle de rétrocontrôle négative activée par le calcium pourrait exister dans laquelle la calcineurine s'associerait à Nrz pour la déphosphoryler, permettant de nouveau son interaction avec l'IP₃R. Par conséquent, la calcineurine en interagissant avec Nrz pourrait alors déphosphoryler l'IP₃R pour inhiber la sortie de calcium depuis le canal. De nombreuses expériences sont nécessaires pour démontrer l'existence d'une telle régulation de Nrz et de l'IP₃R par le couple PKC/calcineurine mais l'étude de ce mécanisme constituerait une étape décisive dans la compréhension de la signalisation calcique au cours de l'épibolie.

Il est également intéressant de noter que l'invalidation du facteur de transcription Mtx2 s'accompagne d'un phénotype similaire à celui observé lors de l'expression de la forme non-phosphorylable de Nrz (Wilkins et al., 2008). Comme Nrz, Mtx2 n'est exprimée que dans le YSL lors de la gastrulation et l'on peut donc imaginer que ce facteur de transcription puisse réguler l'expression de la kinase impliquée dans la phosphorylation de Nrz.

✓ Vagues de calcium du YSL

Nos résultats suggèrent donc très fortement que la phosphorylation de Nrz permet la génération de vagues de calcium dans le YSL au début de l'épibolie. Ces vagues semblent dépendre de l'IP₃R puisque Nrz est capable de réguler leur formation. Ici nous avons pu observer que ces vagues apparaissent de façon cyclique avec une fréquence d'environ 8 min à partir du stade 30% d'épibolie. Ces vagues persistent pendant un peu moins d'une heure puis disparaissent vers le stade 50% d'épibolie. Dans notre étude nous n'avons pas pu observer d'orientation spécifique de ces vagues selon un axe embryonnaire. Ceci provient probablement de la méthode d'imagerie utilisée et il serait intéressant de déterminer s'il existe un pôle de l'embryon où ces vagues sont générées. En effet, la formation de ces vagues doit nécessiter la synthèse d'IP₃ et il doit donc exister un signal localisé dans l'embryon qui active la PLC à un moment précis. Une autre hypothèse, moins probable, serait que la quantité d'IP₃ dans le YSL est constante ; dans ce cas la phosphorylation de Nrz serait alors le signal déclencheur des vagues de calcium. Une mesure des quantités d'IP₃ au cours de l'épibolie pourrait permettre de répondre à cette question.

La fonction de ces vagues de calcium au début de l'épibolie reste encore à être clairement établie. Toutefois, nos résultats suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle dans la formation de l'anneau d'actine-myosine à la marge de l'EVL. En effet, l'expression de la forme non-phosphorylable de Nrz s'accompagne d'une réduction nette de la quantité d'actine à la marge de l'EVL. Des travaux récents suggèrent par ailleurs que l'actine et la myosine commencent à être recrutées à la marge dès 30-40% d'épibolie et que l'anneau se densifie au cours de la progression de l'épibolie (Behrndt et al., 2012). De plus, pendant la myofibrillogénèse l'assemblage des filaments d'actine-myosine est régulé par des pics de calcium durant plusieurs minutes (Ferrari et al., 1996; Li et al., 2004). Ainsi, les vagues de calcium dans le YSL pourraient servir au recrutement et à l'assemblage de l'actine et de la myosine pour former un anneau à la marge des blastomères.

Dans nos travaux nous n'avons pas étudié la possible formation de vagues calciques plus tardivement au cours de l'épibolie. Cependant, nos résultats indiquent que Nrz est également phosphorylée dans les stades plus tardifs de l'épibolie. Il serait donc intéressant d'étudier la signalisation calcique durant ces stades. Il est probable que l'on puisse également observer des élévations de calcium dans le YSL qui pourrait alors permettre la contraction de l'anneau d'actine-myosine notamment via l'activation de la voie Calmoduline/MLCK. En effet, cette voie est très certainement responsable de la contraction de l'anneau d'actine-myosine puisque sa sur-activation lors de l'invalidation de Nrz entraîne la formation précoce et la contraction prématurée de cet anneau.

✓ **Bcl-wav, un nouveau membre atypique de la famille Bcl-2**

Grâce à des travaux de phylogénomie nous avons pu mettre en évidence un nouveau membre de la famille Bcl-2 : la protéine Bcl-wav. Cette dernière arbore toutes les caractéristiques des membres multi-domaines à savoir 4 domaines d'homologie BH, un domaine transmembranaire et une structure prédite en hélices α . Lorsqu'elle est surexprimée de façon ectopique dans des cellules en culture ou dans l'embryon de poisson zèbre, Bcl-wav se comporte comme une protéine pro-apoptotique puisqu'elle induit la libération du cytochrome c dans le cytosol et l'activation des caspases. Nous avons de plus montré que Bcl-wav est une protéine résidente de la mitochondrie où elle s'ancre dans les membranes. La localisation mitochondriale de Bcl-wav est essentielle à son activité pro-apoptotique puisqu'un mutant tronqué de son domaine transmembranaire se localise dans le cytosol et perd sa capacité à induire l'apoptose. Bcl-wav semble donc partager des caractéristiques

communes avec la protéine Bak (qui est absente chez le poisson zèbre). Cependant, il est à noter que, Bcl-wav est incapable d'induire l'apoptose en absence de Bax. De plus, Bcl-wav interagit avec Bax et semble favoriser la localisation mitochondriale de cette dernière. Bcl-wav semble donc plutôt se comporter comme un membre à BH3-seulement. Ainsi, Bcl-wav est un membre pro-apoptotique multi-domaine atypique qui pourrait en fait servir « d'ancrage » à Bax à la mitochondrie pour faciliter son insertion dans la MME.

De façon surprenante, nous avons pu observer lors de l'invalidation de *bcl-wav* chez le poisson zèbre, une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans la queue des embryons à 24 hpf. Comme il est peu probable que Bcl-wav puisse posséder à la fois une activité anti- et pro-apoptotique, cette mort cellulaire est plus certainement due à l'élimination de cellules mal positionnées dans l'embryon du fait notamment de défauts dans les mouvements de convergence et d'extension consécutifs à l'absence de Bcl-wav.

✓ Régulation de l'homéostasie calcique mitochondriale par Bcl-wav

Bcl-wav est donc une protéine mitochondriale et nous avons pu montrer qu'elle contrôle l'entrée de calcium dans la mitochondrie. En effet, des mitochondries issues d'embryons invalidés pour *bcl-wav* ont une capacité moindre à repomper le calcium, alors que dans des cellules en culture, la surexpression de Bcl-wav augmente au contraire la vitesse de repompage des mitochondries en cellules. Cette propriété de Bcl-wav semble en grande partie dépendre de son interaction avec VDAC puisque la délétion du domaine BH4 abolit l'interaction entre les deux protéines et supprime l'effet de Bcl-wav sur l'entrée de calcium dans la mitochondrie. De plus l'action de Bcl-wav sur VDAC peut être contrée par la protéine Bcl-xL. Cette dernière interagit également avec VDAC et une série de données de la littérature suggère qu'elle peut diminuer l'entrée de calcium dans la mitochondrie (Vander Heiden et al., 2001; Roy et al., 2009b). Ainsi, Bcl-wav pourrait appartenir à un complexe avec VDAC et Bcl-xL spécialisé dans la régulation du transport de calcium par la mitochondrie.

Nous avons également montré que Bcl-wav est capable d'interagir avec MCU, l'uniporteur calcique de la membrane mitochondriale interne (MMI). Ce dernier interagit aussi avec VDAC suggérant l'existence d'un canal calcique multi-protéique composé de MCU et VDAC et probablement localisé dans les points de contact entre MME et MMI. En interagissant avec ces deux protéines, Bcl-wav serait donc un régulateur clé de l'entrée de calcium dans la mitochondrie et il serait intéressant d'étudier plus précisément la localisation de Bcl-wav dans la mitochondrie pour voir si on ne la retrouve pas préférentiellement dans

ces points de contact. L'étude poussée de l'effet exercé par Bcl-wav sur MCU pourrait s'avérer particulièrement utile pour la compréhension du mécanisme d'action des protéines de la famille Bcl-2 au niveau mitochondrial.

✓ Effet du calcium sur les mouvements de convergence et d'extension

Nos résultats nous ont permis d'établir que lors de la gastrulation, la dérégulation du trafic de calcium intracellulaire affecte les mouvements de convergence et d'extension. En effet, l'invalidation de *bcl-wav* ou de *mcu* induit une augmentation de la concentration cytosolique de calcium perturbant la migration des cellules mésodermes. Ces perturbations sont associées à une dérégulation de la polymérisation du cytosquelette d'actine dans les protrusions cellulaires nécessaires à la migration. De plus, les cellules semblent également perdre leur polarité puisque les protrusions, normalement formées vers le pôle dorsal de l'embryon, sont réparties aléatoirement dans les blastomères des embryons invalidés pour *bcl-wav* ou *mcu*.

Le lien moléculaire entre le calcium et les protrusions d'actine n'est pas clairement établi ; une interférence est cependant probable avec la voie Wnt/PCP et notamment avec l'activation des RhoGTPases connues pour leur implication dans la dynamique du cytosquelette. En effet, nous avons montré qu'en cellules, l'invalidation de *mcu* entraîne une diminution de l'activation de RhoA. Des résultats similaires ont été obtenus dans des neurones où une élévation de la concentration de calcium cytosolique diminue l'activation de RhoA (Jin et al., 2005). Des expériences supplémentaires sont en revanche nécessaires pour établir la façon dont le calcium peut réduire l'activation de RhoA. Une autre possibilité serait que RhoA et Rac soient au contraire suractivées. En effet, il a été montré qu'une élévation localisée de la concentration de calcium peut induire l'activation de ces deux RhoGTPases via la CaMKII (Murakoshi et al., 2011). Ainsi, une concentration élevée de calcium dans toute la cellule pourrait provoquer une activation persistante des RhoGTPases induisant alors une perturbation de la dynamique du cytosquelette d'actine. De la même façon, lors la migration cellulaire, un gradient de calcium se met normalement en place dans la cellule avec des pics de concentration très localisées apparaissant lors de la formation des protrusions d'actine. Ainsi, l'élévation de calcium dans le cytosol pourrait « masquer » ces pics de calcium et affecter la localisation des protrusions d'actine.

Des expériences portant sur le niveau d'activation des RhoGTPases au cours de la gastrulation chez des embryons normaux ou invalidés pour *bcl-wav* sont nécessaires pour mieux comprendre l'activité de cette dernière dans le développement du poisson zèbre.

✓ Les protéines Bcl-2 comme régulateurs de l'homéostasie calcique

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent qu'au cours du développement embryonnaire, la fonction primaire de Nr2f1 et Bcl-wav n'est pas de réguler l'apoptose mais bel et bien de contrôler l'homéostasie calcique et la dynamique du cytosquelette dans l'embryon. Par analogie, il est ainsi probable que, chez les mammifères, certains membres de la famille Bcl-2 puissent jouer un rôle similaire. Parmi ceux-là, l'orthologue humain de Nr2f1, Bcl2l10, qui est très fortement exprimée dans les ovocytes, est un candidat naturel et il apparaît important d'étudier la contribution de Bcl2l10 à la maturation et à la fécondation de l'ovocyte, étapes où la signalisation calcique joue un rôle primordial. Bcl-wav ne possède pas d'orthologue chez les mammifères mais Bak semble un bon candidat pour jouer un rôle similaire puisqu'elle est majoritairement mitochondriale et interagit également avec VDAC. Le knockout de *bak* ne semble toutefois pas avoir de conséquences significatives chez la souris (Lindsten et al., 2000) au moins pour ce qui concerne l'apoptose. L'étude des souris déficientes pour *bak* sous le spectre de la signalisation calcique pourrait malgré tout révéler d'autres fonctions pour cette protéine chez les mammifères.

D'une manière plus générale l'invalidation des gènes de la famille *bcl-2* chez la souris ont toujours été analysés en recherchant des défauts de mort cellulaire, nous pensons qu'il est important d'étudier si certains membres de la famille ne peuvent pas jouer des rôles alternatifs en contrôlant l'homéostasie calcique. L'utilisation de stratégies « knock-in » permettant de cibler ces protéines exclusivement au RE pourrait apporter des éléments de réponses de ce point de vue.

Finalement, nos résultats suggèrent qu'à travers leur capacité à réguler le trafic intracellulaire de calcium, les protéines de la famille Bcl-2 contrôlent des processus divers tels que la contraction des filaments d'actine-myosine ou la migration cellulaire. D'autres études ont montré que lors de l'activation des lymphocytes, le contrôle de l'homéostasie calcique par les protéines Bcl-2 est également essentiel. Ainsi, plusieurs fonctions non-apoptotiques des protéines Bcl-2 semblent dépendre de leur capacité à réguler les flux intracellulaires de calcium. Le calcium pourrait donc être un point commun aux fonctions non-apoptotiques des protéines Bcl-2 et l'élucidation des mécanismes leur permettant de contrôler l'homéostasie

calcique devrait donc permettre de mieux appréhender le large champ d'action de cette famille de protéines.

ANNEXES

Article annexe n°1

Cytoskeleton dynamics in early zebrafish development: a matter of phosphorylation?

Bonneau B, Popgeorgiev N, Prudent J, Gillet G

Bioarchitecture, 2011 Sep 1;1(5):216-220.

Cytoskeleton dynamics in early zebrafish development

A matter of phosphorylation?

Benjamin Bonneau, Nikolay Popgeorgiev, Julien Prudent and Germain Gillet*

Université Lyon I; Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon; Centre Léon Bérard; Lyon, France

Early morphogenic movements are an important feature of embryonic development in vertebrates. During zebrafish gastrulation, epiboly progression is driven by the coordinated remodeling of the YSL microtubule network and F-actin cables. We recently described the implication of Nr2f1, an anti-apoptotic Bcl-2 homolog, in the control of the YSL cytoskeleton dynamics. Nr2f1 knock-down induces premature actin-myosin ring formation leading to margin constriction, epiboly arrest and embryo lethality. At the molecular level, the Nr2f1 protein controls the actin-myosin dynamics through IP3R-dependent calcium levels variation. Here, we discuss these novel findings and propose a model in which reversible phosphorylation of the Nr2f1/IP3R complex modulates the permeability of the IP3R calcium channel and thus may explain the Nr2f1-dependent control of IP3R opening required for proper epiboly completion.

Early embryonic development is a complex process requiring highly coordinated signals to shape the embryo and set up the body plan of the future adult. During zebrafish gastrulation, a series of cell rearrangements and movements result in the formation of the three germ layers (the endoderm, the ectoderm and the mesoderm) as well as the dorsoventral and anteroposterior axes. The first morphogenic movement of gastrulation, known as epiboly, begins just at the end of the blastula period.¹ At this time, the embryo is organized into three cell layers; the enveloping cell layer (EVL) and the deep cell layer (DCL) forming the blastoderm,

which is laid on top of the yolk syncytial layer (YSL) (Fig. 1). This latter layer is formed during blastula period when the blastomeres in contact with the yolk release their entire content in the yolk cell. Epiboly is characterized by the migration of the blastoderm from the animal pole down to the vegetal pole. This process can be divided into three phases: initiation, progression and completion.² During the initiation phase, part of the YSL spreads beneath the blastoderm forming the internal-YSL (I-YSL) while the other part of the YSL, called the external-YSL (E-YSL), forms a ring under the EVL. As the yolk spreads toward the animal pole, the blastoderm thins out and the DCL moves radially outward to eventually form a cap of cells over the yolk. Once this so-called dome stage is reached, epiboly begins. During this phase, the blastoderm continues to grow thinner and all three layers migrate coordinately toward the vegetal pole until they reach the equator of the embryo (50% epiboly). At this point, the DCL migration pauses, allowing other gastrulation movements to begin while EVL and E-YSL migration continues. Finally, the EVL keeps on moving until the entire yolk cell is covered.

The molecular mechanisms underlying epiboly are still under debate but it seems that cytoskeleton dynamics plays a crucial role in this process. Indeed, it was shown that the yolk cell harbors a large number of microtubules, which play a central role in epiboly initiation and progression. These microtubules are organized in a dense network in the YSL from which parallel arrays of microtubules extend toward the vegetal pole of the yolk cell (Fig. 1). This

Keywords: zebrafish, Nr2f1, calcium, IP3R, Bcl-2, actin cytoskeleton, phosphorylation

Submitted: 09/06/11

Accepted: 09/15/11

<http://dx.doi.org/10.4161/bioa.1.5.18116>

*Correspondence to: Germain Gillet;
Email: germain.gillet@lyon.unicancer.fr

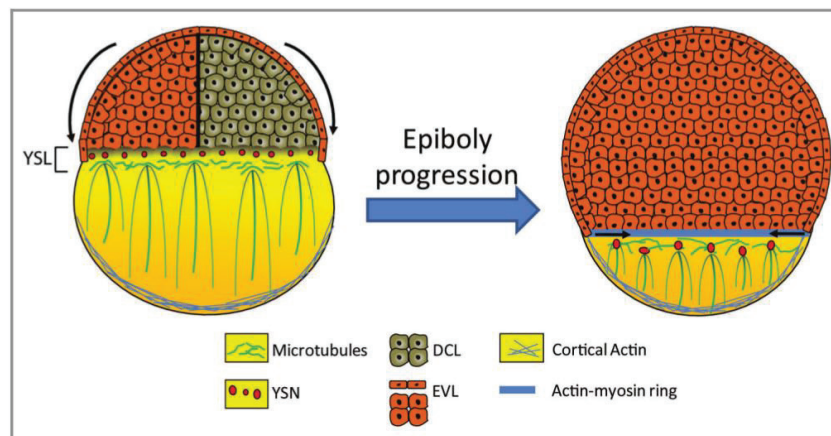


Figure 1. Schematic representation of the epiboly progression during early zebrafish development. During epiboly, the blastomeres migrate toward the vegetal pole to envelope the yolk cell. This morphogenic movement is orchestrated by the coordinate changes in the yolk syncytial layer (YSL) cytoskeleton mainly composed of microtubules and F-actin cables. Parallel microtubule meshwork originating from the yolk syncytial nuclei (YSN) are extending toward the vegetal embryo pole, and participates actively in the epiboly progression. The margin actin-myosin ring formed at 75% epiboly is important for the completion of the epiboly. EVL, enveloping layer; DCL, deep cell layer.

latter network grows shorter as epiboly progresses; it should be noted that when it is disrupted, YSL migration stops while EVL and DCL migration slows down, suggesting that YSL microtubules drive, at least in part, epiboly progression.

The actin cytoskeleton also seems to be implicated in epiboly movements. Indeed, during gastrulation, a distinct actin-based structure, called the actin-myosin ring, forms at the interface of the EVL and the E-YSL around 75% epiboly (Fig. 1). This actin-myosin ring was first proposed to participate in the contraction of the margin which ensures blastopore closure at the end of epiboly.³ More recently, it was shown that the actin-myosin ring can also contract earlier during epiboly. It was thus proposed that this contraction may be involved in changing the shape of the adjacent EVL cells and reducing the circumference of the margin in motion to fit the shape of the yolk cell.⁴

The mechanisms underlying the contraction of the actin-myosin ring are still under investigation. Köppen and colleagues showed that Msn1, a Ste20-like kinase, participates in the recruitment of actin and myosin light chain 2 (MLC2) in the YSL and promotes actin ring contraction.⁴ Calcium may be another key regulator of actin ring contraction. Indeed, two different studies report that after 50%

epiboly, high calcium levels are transiently observed at the margin of the blastoderm from which the actin ring originates.^{5,6} This model of calcium-induced actin contraction is corroborated by the fact that calcium chelation inhibits actin ring formation.³ Furthermore, it was shown that a mutation in MAPKAPK2 is associated with premature ring contraction and ectopic calcium levels increase in the blastoderm.⁷ Finally, we recently demonstrated that the knock-down of *nrx*, a member of the *bcl-2* family of apoptosis inhibitors, induces similar premature actin ring contraction.⁸ Indeed, we showed that this contraction is triggered by increased calcium levels at the margin between the blastoderm and the YSL. In this particular situation, calcium presumably activates the calcium-dependent protein calmodulin which in turns may activates the myosin light chain kinase (MLCK) leading to increased myosin phosphorylation and subsequent actin-myosin contraction. Interestingly, during epiboly, *Nrx* expression is restricted to the YSL which contains significant amount of endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria. In fact, *Nrx* is located to both organelles; of note, at the ER, *Nrx* interacts with the Inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 (IP3R1) thus regulating calcium release through this channel. These results reveal

that by interacting with IP3R1, *Nrx* controls calcium fluxes inside the YSL and regulates actin-myosin ring formation during epiboly. Together, the above studies point out to the critical role of calcium signaling in the dynamics of the actin cytoskeleton during epiboly progression. How calcium signaling is regulated during epiboly remains an open question. Indeed, calcium is a versatile messenger requiring to be finely tuned as excess or lack of calcium is detrimental for the developing embryo. As a matter of fact, an underlying regulatory mechanism may be based on the interaction between *Nrx* and IP3R1 in the YSL.

Of note, *Nrx* is present as soon as the YSL forms and its expression increases as epiboly progresses. We can thus assume that before 50% epiboly, *Nrx* strongly interacts with IP3R1 in the YSL thus preventing abnormal calcium release from the ER and inhibiting premature actin ring formation. However, around 60% epiboly, calcium transients begin originating from the margin of the migrating blastoderm. It is still unclear if these transients originate from the blastomeres or the YSL but we can assume that at least some of them come from the YSL as the actin-myosin ring is localized at the interface of the EVL and the YSL. Thus at this stage, the interactions between *Nrx* and IP3R are

expected to be finely regulated to control calcium fluxes in the YSL.

To confirm this hypothesis it appears critical to determine how Nrz interacts with IP3R1 and regulates calcium release from the ER. Indeed, until now several studies have pointed out to a role of the Bcl-2 proteins on IP3R-dependent calcium release from the ER, but the underlying mechanism is still a matter of intense debate. The members of the Bcl-2 family, including Bcl-2 and Bcl-X_L, were shown to interact with IP3R and decrease calcium release from the ER; however, while according to certain studies this might be the consequence of increased calcium leakage thus reducing ER calcium content,^{9,10} other reports support direct inhibition of calcium release through IP3R.¹¹ Our data indicate that in the zebrafish embryo, Nrz seems to directly inhibit IP3R-dependent calcium release since *nrz* knock-down significantly increases cytosolic calcium levels whereas treatment of *nrz*-invalidated embryos with IP3R inhibitors restores normal development. To further understand how Nrz inhibits IP3R-dependent calcium release it is required to determine which domain of Nrz interacts with IP3R1. It should be noted that Bcl-2 interacts with IP3R1 via its BH4 (Bcl-2 homology 4) domain; moreover, this domain alone is able to inhibit calcium release through IP3R1. In contrast, the BH4 domain of Bcl-X_L does not affect IP3R1 permeability,¹² suggesting that additional BH domains presumably participate to the regulation of IP3R-dependent calcium release. Actually, the BH4 domain is the less conserved domain among the Bcl-2 family; thus, due to this variability, the BH4 domain of some Bcl-2 family members may be unable to bind IP3R1 or regulate channel opening. Our results indicate that Nrz binds IP3R1 via BH4 and that this domain is essential for Nrz-induced inhibition of IP3R1. However whether the Nrz BH4 domain alone can inhibit calcium release through IP3R1 is not known.

In the same line, the Nrz binding site within IP3R1 remains to be characterized. So far, the characterization of the interaction domains between the Bcl-2 family members and IP3R is still a highly controversial issue. Recently, White and

colleagues reported that the Bcl-2 binding site would be located at the C-terminus of IP3R,¹³ while in contrast the team of Distelhorst proposed this binding site to be in the modulatory domain of IP3R, right in the middle of the protein.¹⁴ Interestingly, both groups agree that Bcl-2 members do not interact with the inositol 1,4,5-triphosphate [Ins(1,4,5)P₃] binding domain suggesting that they do not compete for the interaction of the ligand with IP3R. There is no doubt that removing this kind of ambiguity is a prerequisite to understand the regulation of Nrz/IP3R interactions. Indeed, a number of regulatory binding partners of IP3R have been identified,^{15,16} and, depending on the location of the Nrz binding site(s) within the IP3R subunits, different proteins are expected to affect this interaction and the opening of the calcium channel. Inhibition or activation of IP3R by direct interaction have been seldom described, indeed the most common regulation of IP3R calcium permeability appears to occur via phosphorylation or dephosphorylation mechanisms.

So far numerous protein kinases or phosphatases were described to interact with IP3R and to regulate its opening via phosphorylation or dephosphorylation at specific sites which are well conserved among species including zebrafish. In general, phosphorylation of IP3R is associated with its activation and it has been shown that Bcl-2 modulates the phosphorylation status of IP3R. Indeed, it was reported that Bcl-2 can directly interact with calcineurin,¹⁷ a calcium/calmodulin-dependent phosphatase known to dephosphorylate IP3R.¹⁸ In this latter study, the authors showed that calcineurin specifically regulates the increased IP3R-dependent calcium release induced by protein kinase C (PKC) phosphorylation of IP3R. Thus, by recruiting calcineurin, Bcl-2 may trigger IP3R dephosphorylation and control the IP3R-dependent calcium release. Interestingly, it should be noted that Bcl-2 could also be phosphorylated by several kinases including PKC which phosphorylate Bcl-2 at Ser70, a residue located in an unstructured loop at the N-terminus of the protein between the BH4 and BH3 domains.¹⁹ Bcl-2 phosphorylation on serine or threonine

residues in this loop is associated to its inactivation since mutation of these phosphorylated sites enhances anti-apoptotic effect of Bcl-2.^{20,21} More interestingly, a non-phosphorylatable form of Bcl-2 was shown to be more efficient to decrease calcium release through IP3R compared with native Bcl-2.²² In addition, as Bcl-2 interacts with calcineurin, the PKC-dependent phosphorylation should be reversibly dephosphorylated by calcineurin. Finally, it should be noted that Nrz also harbors an unstructured loop between its BH4 and BH3 domains and that this loop contains two serine residues and one threonine residue as Bcl-2, it can thus be speculated that similar phosphorylation may occur in Nrz too.

Considering these data, we built a model for the control of IP3R1/Nrz interactions by reversible phosphorylation and dephosphorylation (Fig. 2). According to this model, before the embryo reaches 50% epiboly, Nrz interacts with IP3R1 and keeps the channel in closed-state by an unknown mechanism possibly mediated by a phosphatase, such as calcineurin, or by direct inhibition via the interaction of Nrz with IP3R regulatory domain. Then, after the migrating cells crossed the equator, a signal is expected to originate from the embryo to trigger calcium transients and subsequent formation of contractile actin rings. This signal presumably activates phospholipase C (PLC), generating Ins(1,4,5)P₃, the ligand of IP3R, and diacylglycerol (DAG) which in turn activates PKC.²³ Activated PKC may then phosphorylate both Nrz and IP3R1, thus resulting in Nrz loss of function and subsequent activation of IP3R1 which allows calcium release from the ER upon Ins(1,4,5)P₃ binding. Interestingly, the PKC-dependent phosphorylation of IP3R is inhibited by calcium,²⁴ consequently the maintenance of low levels of calcium in the YSL due to Nrz interaction with IP3R should promote phosphorylation of the channel. Finally, calcium release may, on the one hand, activate calmodulin which is consequently prone to interact with MLCK and promote MLC2 phosphorylation, thus inducing actin-myosin ring contraction. On the other hand, calcium and calmodulin may activate calcineurin which could in turn dephosphorylate both

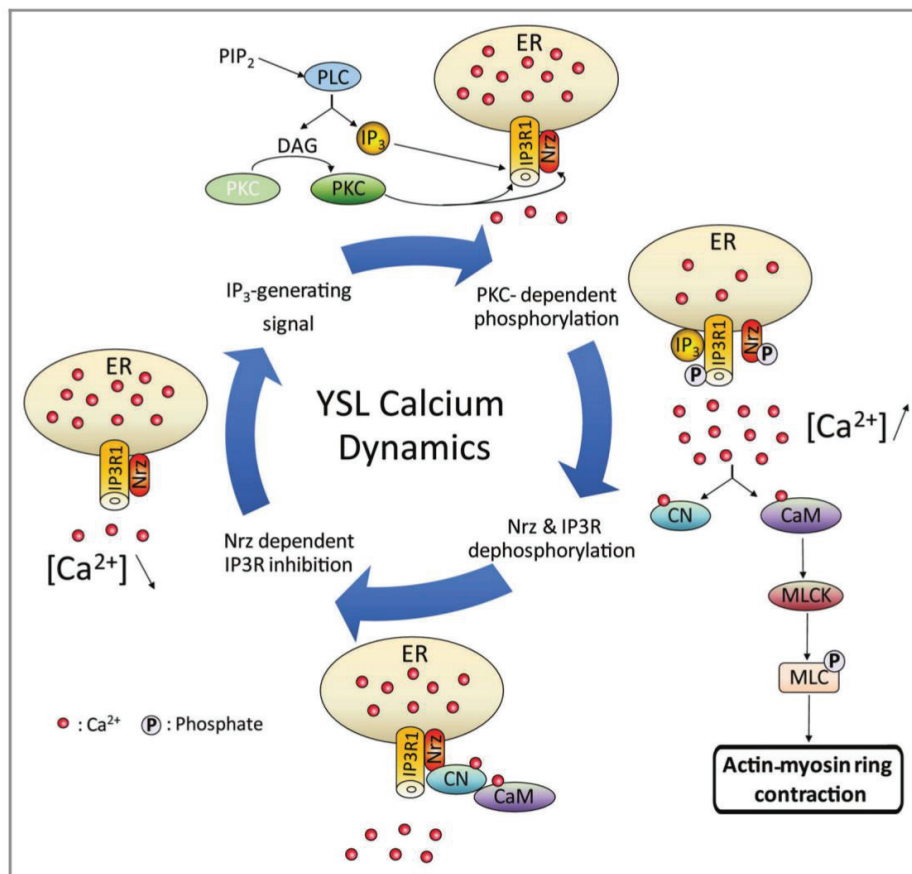


Figure 2. Schematic drawing of possible model of NrZ-dependent IP3R1 regulation during epiboly completion. Prior to actin-myosin ring formation NrZ interacts with IP3R1 and inhibits its opening. As epiboly progresses $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ inducing signals trigger Phospholipase C (PLC) molecular cascade which activates PKC. Synergic action of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ and PKC dependent IP3R1/NrZ phosphorylation induces intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ increase, with subsequent actin-myosin ring formation through (CaM) calmodulin/MLCK pathway. Calcineurin (CN) feedback dephosphorylation results in increasing of IP3R1/NrZ interaction and decreasing of intracellular calcium levels.

NrZ and IP3R1 by interacting with NrZ and prevent channel opening. This feedback loop may be of major importance during epiboly since abnormal calcium levels in the YSL may induce unwanted actin ring contraction leading to the detachment of the blastoderm from the yolk and thus death of the embryo.

In conclusion, there is a growing body of evidence that epiboly and subsequent gastrulation stages are driven, at least in

part, by calcium signaling and the activity of IP3R. Thus this channel, which is at the crossroads of a number of kinase-dependent pathways appear to be a key integrator of the various signals upstream of these pathways, ensuring precise time and space dependent progression of epiboly via the fine tuning of calcium transients throughout the embryo. Here we propose that reversible phosphorylation of the NrZ/IP3R complex is critical for

proper calcium signaling and subsequent actin cytoskeleton remodeling in the developing embryo. According to this model a phosphorylation/dephosphorylation loop may be implicated in generating temporally controlled calcium transients and actin-myosin ring contraction, which drive epiboly progression. If confirmed, this hypothesis may give new insights into calcium signaling and cytoskeleton dynamics during early zebrafish development.

References

1. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995; 203:253-310; PMID: 8589427; <http://dx.doi.org/10.1002/aja.1002030302>
2. Betchaku T, Trinkaus JP. Contact relations, surface activity, and cortical microfilaments of marginal cells of the enveloping layer and of the yolk syncytial and yolk cytoplasmic layers of fundulus before and during epiboly. *J Exp Zool* 1978; 206:381-426; PMID: 568653; <http://dx.doi.org/10.1002/jez.1402060310>
3. Cheng JC, Miller AL, Webb SE. Organization and function of microfilaments during late epiboly in zebrafish embryos. *Dev Dyn* 2004; 231:313-23; PMID: 15366008; <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.20144>
4. Köppen M, Fernandez BG, Carvalho L, Jacinto A, Heisenberg CP. Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and *Drosophila*. *Development* 2006; 133:2671-81; PMID: 16794032; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02439>
5. Créton R, Speksnijder JE, Jaffé LF. Patterns of free calcium in zebrafish embryos. *J Cell Sci* 1998; 111:1613-22; PMID: 9601092
6. Gilland E, Miller AL, Karplus E, Baker R, Webb SE. Imaging of multicellular large-scale rhythmic calcium waves during zebrafish gastrulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:157-61; PMID: 9874788; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.1.157>
7. Holloway BA, Gomez de la Torre Canny S, Ye Y, Slusarski DC, Freisinger CM, Dosch R, et al. A novel role for MAPKAPK2 in morphogenesis during zebrafish development. *PLoS Genet* 2009; 5:e1000413; PMID: 19282986; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000413>
8. Popgeorgiev N, Bonneau B, Ferri KF, Prudent J, Thibaut J, Gillet G. The apoptotic regulator Nr2 controls cytoskeletal dynamics via the regulation of Calcium trafficking in the zebrafish blastula. *Dev Cell* 2011; 20:663-76; PMID: 21571223; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.03.016>
9. Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, et al. Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol* 2000; 148:857-62; PMID: 10704437; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.148.5.857>
10. Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. The Calcium concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J* 2001; 20:2690-701; PMID: 11387204; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.11.2690>
11. Rong YP, Aromolaran AS, Bultynck G, Zhong F, Li X, McColl K, et al. Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. *Mol Cell* 2008; 31:255-65; PMID: 18657507; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.014>
12. Monaco G, Decrock E, Ald H, Ponsaerts R, Vervliet T, Luyten T, De Maeyer M, Missiaen L, Distelhorst CW, De Smedt H, Parys JB, Leybaert L, Bultynck G. Selective regulation of IP(3)-receptor-mediated Ca(2+) signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-XL. *Cell Death Differ* 2011.
13. Eckenrode EF, Yang J, Velmurugan GV, Foskett JK, White C. Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Calcium signaling. *J Biol Chem* 2010; 285:13678-84; PMID: 20189983; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.096040>
14. Rong YP, Bultynck G, Aromolaran AS, Zhong F, Parys JB, De Smedt H, et al. The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:14397-402; PMID: 19706527; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0907555106>
15. Choe CU, Ehrlich BE. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. *Sci STKE* 2006; 2006:re15.
16. Vanderheyden V, Wakai T, Bultynck G, De Smedt H, Parys JB, Fissore RA. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 function during oocyte maturation by MPM-2 phosphorylation. *Cell Calcium* 2009; 46:56-64; PMID: 19482353; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2009.04.004>
17. Shibasaki F, Kondo E, Akagi T, McKeon F. Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature* 1997; 386:728-31; PMID: 9109491; <http://dx.doi.org/10.1038/386728a0>
18. Cameron AM, Steiner JP, Roskams AJ, Ali SM, Ronnett GV, Snyder SH. Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Calcium flux. *Cell* 1995; 83:463-72; PMID: 8521476; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90124-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90124-8)
19. Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem* 1999; 274:20296-300; PMID: 10400650; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.29.20296>
20. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 1999; 19:8469-78; PMID: 10567572
21. Shitashige M, Toi M, Yano T, Shibata M, Matsuo Y, Shibasaki F. Dissociation of Bax from a Bcl-2/Bax heterodimer triggered by phosphorylation of serine 70 of Bcl-2. *J Biochem* 2001; 130:741-8; PMID: 11726273
22. Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, Pozzan T, Korsmeyer SJ. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Calcium homeostasis and apoptosis. *EMBO J* 2004; 23:1207-16; PMID: 15010700; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600104>
23. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361:315-25; PMID: 8381210; <http://dx.doi.org/10.1038/361315a0>
24. Vermassen E, Fissore RA, Nadif Kasri N, Vanderheyden V, Callewaert G, Missiaen L, et al. Regulation of the phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319:888-93; PMID: 15184066; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.071>

Article annexe n°2

Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: The calcium connection.

Bonneau B, Prudent J, Popgeorgiev N, Gillet G

Biochim Biophys Acta, 2013 Jul;1833(7):1755-65.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr



Review

Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: The calcium connection[☆]

Benjamin Bonneau^{a,*}, Julien Prudent^a, Nikolay Popgeorgiev^b, Germain Gillet^{a,**}

^a Université de Lyon, Université Lyon 1, Inserm U1052, CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France

^b Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes, URMITE UM63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, Aix-Marseille Université, Faculté de médecine, Marseille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 November 2012

Received in revised form 11 January 2013

Accepted 12 January 2013

Available online 27 January 2013

Keywords:

Bcl-2

Calcium

Endoplasmic reticulum

Mitochondria

Non-apoptotic

Apoptosis

ABSTRACT

The existence of the *bcl-2* (B-cell lymphoma-2) gene was reported nearly 30 years ago. Yet, Bcl-2 family group of proteins still surprises us with their structural and functional diversity. Since the discovery of the Bcl-2 family of proteins as one of the main apoptosis judges, the precise mechanism of their action remains a hot topic of intensive scientific research and debates. Although extensive work has been performed on the role of mitochondria in apoptosis, more and more studies point out an implication of the endoplasmic reticulum in this process. Interestingly, Bcl-2 family proteins could be localized to both the mitochondria and the endoplasmic reticulum highlighting their crucial role in apoptosis control. In particular, in these organelles Bcl-2 proteins seem to be involved in calcium homeostasis regulation although the mechanisms underlying this function are still misunderstood. We now assume with high degree of certainty that the majority of Bcl-2 family members take part not only in apoptosis regulation but also in other processes important for the cell physiology briefly denominated as “non-apoptotic” functions. Drawing a complete and comprehensive image of Bcl-2 family requires the understanding of their implications in all cellular processes. Here, we review the current knowledge on the control of calcium homeostasis by the Bcl-2 family at the endoplasmic reticulum and at the mitochondria. Then we focus on the non-apoptotic functions of the Bcl-2 proteins in relation with the regulation of this versatile intracellular messenger. This article is part of a Special Issue entitled: 12th European Symposium on Calcium.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. The Bcl-2 family of proteins and apoptosis

Historically, *bcl-2* (B-cell lymphoma-2) gene was discovered at a chromosomal translocation, t(14;18), associated with B-cell follicular lymphoma. This translocation places *bcl-2* under the control of the immunoglobulin gene enhancer leading to abnormal high-level expression of Bcl-2 [1–3]. However, contrary to other oncogenes characterized so far, Bcl-2 acts by inhibiting cell death rather than promoting cell proliferation [4]. Bcl-2 was thus initially characterized as a mitochondrial resident protein that blocks apoptotic programmed cell death [5]. Since the discovery of Bcl-2, extensive work on various animal models, from worms to mammals, uncovered a family of proteins involved in the control of apoptosis and sharing structural homology with the canonical member Bcl-2 [6]. In vertebrates, members of the

so called Bcl-2 family are globular proteins containing α -helices and characterized by the presence of at least one Bcl-2 homology (BH) domain. According to their function in apoptosis, Bcl-2 family members are designated as anti- or pro-apoptotic. Anti-apoptotic proteins (e.g. Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1) contain four BH domains and a hydrophobic transmembrane (TM) domain essential for their localization into biological membrane. Pro-apoptotic proteins can be further subdivided into two groups. The effector proteins Bax and Bak contain four BH domains and a TM domain whereas BH3-only proteins (e.g. Bad, Bid, and Bik) possess just one BH domain and no TM domain with the exception of Bik and Hrk [7,8].

The Bcl-2 family proteins play a crucial role in the control and the execution of the intrinsic, or mitochondrial, pathway of apoptosis. In this process, some death stimuli (e.g. growth factor deprivation, and DNA damage) activate BH3-only proteins which in turn lead to the activation of Bax and/or Bak either directly or by inhibiting anti-apoptotic members. Activated Bax/Bak then oligomerize at the mitochondria to induce outer mitochondrial membrane (OMM) permeabilization and release into the cytosol of apoptotic factors (e.g. cytochrome c and AIF) which promote caspase activation and subsequent apoptosis execution. Anti-apoptotic members of Bcl-2 family are able to prevent OMM permeabilization via a direct inhibitory interaction with pro-apoptotic members [8].

[☆] This article is part of a Special Issue entitled: 12th European Symposium on Calcium.

* Correspondence to: B. Bonneau, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Bat. Cheney D, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec 69008, Lyon, France. Tel.: +33 4 69 16 66 10.

** Correspondence to: G. Gillet, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Bat. Cheney D, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec 69008, Lyon, France. Tel.: +33 4 69 16 66 56; fax: +33 4 69 16 66 60.

E-mail addresses: benjamin.bonneau@lyon.unicancer.fr (B. Bonneau), germain.gillet@univ-lyon1.fr (G. Gillet).

2. Endoplasmic reticulum Ca^{2+} and apoptosis

Although the mitochondrion is a key organelle for promoting apoptosis, a growing body of evidence underlies the involvement of endoplasmic reticulum (ER) in this process. The ER is the major site of folding, modification, and trafficking of proteins as well as the main store for intracellular Ca^{2+} . These functions of the ER are tightly connected as Ca^{2+} is required for protein synthesis in almost every cell type. In the ER, Ca^{2+} supports early protein processing and protein glycosylation. In addition, Ca^{2+} may also be implicated in subunit assembly and protein folding [9]. Thus, the reduction of ER Ca^{2+} level can induce the accumulation and aggregation of unfolded proteins, a condition referred to as ER stress. To face this stress, cells activate a pro-survival response known as the Unfolded Protein Response (UPR) to reduce the accumulation of unfolded protein. However if the UPR's mechanisms are insufficient to decrease unfolded protein load, the UPR activates apoptosis [10]. In this case, components of the UPR induce apoptosis via the inactivation of Bcl-2 and the activation of several BH3-only proteins including Bim, Bad, Bik and Puma which then activate Bax and Bak to promote cytochrome c release from the mitochondria. Interestingly, a cross-talk exists between the UPR and apoptosis as Bax/Bak have been proposed to participate in early events of the UPR [11].

Moreover a number of stresses, including ER stress, can lead to the release of the ER Ca^{2+} store and subsequent increase of cytosolic Ca^{2+} levels [10,12]. Cytosolic Ca^{2+} elevation could in turn induce apoptosis via several pathways independent or not from the mitochondria.

The first one is triggered by the caspase-12 independently of mitochondria. This caspase localized at the ER [13,14] can be cleaved and activated by the Ca^{2+} -dependent protease, Calpain [15]. Activated caspase-12 then processes downstream caspases leading to apoptosis independently of OMM permeabilization [16].

Secondly, $[\text{Ca}^{2+}]$ rise into the cytosol may lead to OMM permeabilization through BH3-only protein activation. In particular, Calpain-mediated Bid cleavage into its active form tBid was reported to induce apoptosis in a Bax-dependent manner [17]. In addition, Calpain cleavage of Bcl-2 and Bcl-xL N-terminus reduces their anti-apoptotic activity and even promotes Bcl-2 conversion into a pro-apoptotic protein which promotes cytochrome c release on its own [18]. Bad is another BH3-only member which could be activated in response to Ca^{2+} elevation. Under physiological conditions, Bad is phosphorylated and sequesters in the cytosol by 14–3–3 proteins [19]. However, elevation of cytosolic Ca^{2+} levels activates the Ca^{2+} -dependent phosphatase, Calcineurin (also known as PP2B) which dephosphorylates Bad therefore activating the intrinsic mitochondrial pathway [20]. Interestingly, it has also been shown that a slight increase of Ca^{2+} could, on the contrary, promote Bad phosphorylation and sequestration by 14–3–3 via the activation of the Ca^{2+} /Calmodulin dependent protein kinase kinase (CaMKK) highlighting the versatility of Ca^{2+} signaling in cell fate [21].

Finally, massive Ca^{2+} release from the ER can directly trigger cytochrome c release from the mitochondria. Indeed, the ER and the mitochondria have long been known to be tightly associated [22,23]. More recent research established that ER membranes are in close contact with mitochondria, forming microdomains called MAM for mitochondria-associated membranes [24]. MAM are enriched in transmembrane proteins such as PACS-2 or Mitofusin-2 which directly tether the ER and the mitochondria thus creating a physical interaction between them [25,26]. These contact points are crucial for lipid and Ca^{2+} exchanges between ER and mitochondria. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP_3R) located at the ER membrane play an essential role in ER to mitochondria Ca^{2+} trafficking [27,28]. In MAM, IP_3R seems to be part of a protein complex with Grp75 and the mitochondrial Voltage Dependent Anion Channel (VDAC) that promotes Ca^{2+} exchange between ER and mitochondria [29]. $[\text{Ca}^{2+}]$ in MAM can reach a very high level compared to the cytosolic concentration [30] which is consistent with a specialized function in Ca^{2+} transfer between

ER and mitochondria. Indeed, the recently identified Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU) [31,32] requires a high level of Ca^{2+} to open due to its interaction with MICU1 which acts as a gatekeeper by setting a threshold for Ca^{2+} entry into mitochondria [33]. Thus, Ca^{2+} released through IP_3R in MAM can be rapidly uptaken into the mitochondria by VDAC and MCU to enter mitochondrial matrix [34]. Interestingly, IP_3R has been acknowledged to be required for apoptosis in some cases [35–38]. Therefore, upon a stress inducing massive Ca^{2+} release through IP_3R , mitochondria face very high level of calcium and uptake it to buffer cytosolic Ca^{2+} . When Ca^{2+} accumulates in the mitochondria it binds to Cyclophilin D which induces the opening of the permeability transition pore (PTP) and finally leads to cytochrome c release [39].

3. Regulation of ER Ca^{2+} homeostasis by Bcl-2 proteins

The concept that members of the Bcl-2 family could be localized to the ER [40] and control apoptosis through ER Ca^{2+} homeostasis regulation, emerged almost two decades ago. However, in spite of increasing number of studies, the mechanisms by which the Bcl-2 proteins exert this function are still unclear and subject to controversy (Fig. 1).

3.1. Regulation by anti-apoptotic proteins

The first observation suggesting a role for Bcl-2 on intracellular Ca^{2+} homeostasis was made in 1993 [41]. The authors demonstrated that, in Interleukin-3 (IL-3)-dependent hematopoietic cells, IL-3 withdrawal induces apoptosis by a Ca^{2+} transfer from the ER to the mitochondria. In this model, Bcl-2 overexpression prevents apoptosis and blocks this Ca^{2+} flux. In this study, the thapsigargin-releasable Ca^{2+} pool before IL-3 withdrawal was not affected by Bcl-2 suggesting that Bcl-2 does not alter ER Ca^{2+} content but rather acts on Ca^{2+} release from the ER. The year after, two other studies concluded that Bcl-2 decreases Ca^{2+} release from the ER. The first showed that Bcl-2 prevents cytosolic Ca^{2+} increase induced by serum withdrawal in NIH3T3 cells [42]. The second reported that Bcl-2 was able to inhibit thapsigargin-induced apoptosis [43]. Here the authors showed that Bcl-2 reduces Ca^{2+} efflux from the ER following thapsigargin treatment but that this effect was not due to alteration in Ca^{2+} homeostasis within the ER lumen. The same effect was observed upon hydrogen peroxide treatment suggesting that Bcl-2 can reduce Ca^{2+} release from the ER to prevent apoptosis induced by various stresses [44,45]. However, subsequent studies showed that Bcl-2 is able to increase Ca^{2+} uptake in the ER and then enhanced ER Ca^{2+} load under certain conditions. He and colleagues showed that overexpression of Bcl-2 maintains ER Ca^{2+} homeostasis when the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) is inhibited by thapsigargin or when the extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ is decreased [46]. Here, Bcl-2 does not seem to prevent SERCA inhibition so the authors concluded that Bcl-2 could mediate Ca^{2+} uptake in the ER. They proposed that Bcl-2, by preventing oxidative damage to the ER membrane, could decrease Ca^{2+} leak through the ER and thus increase Ca^{2+} loading capacity of the ER. They also hypothesized that this effect of Bcl-2 could be due to the formation of cation-selective channel in lipid bilayer by Bcl-2 or Bcl-xL [47,48] thus allowing Ca^{2+} entry into the ER lumen. However, this hypothesis does not take into account the existing calcium gradient across the ER membrane, rendering unlikely the passive calcium transport through Bcl-2 channels. Other studies also reported an increased Ca^{2+} load of the ER when Bcl-2 is overexpressed but in this case it was attributed to an increase level of SERCA expression [49,50]. Interestingly, the authors also described an interaction between Bcl-2 and SERCA which was proposed to enhance SERCA activity [44]. Such interaction was also suggested in *Xenopus* oocytes where Bcl-2 was shown to desensitize SERCA to thapsigargin thanks to its BH4 domain [51]. In all these studies, it was assumed that the anti-apoptotic effect of Bcl-2 was mediated by a

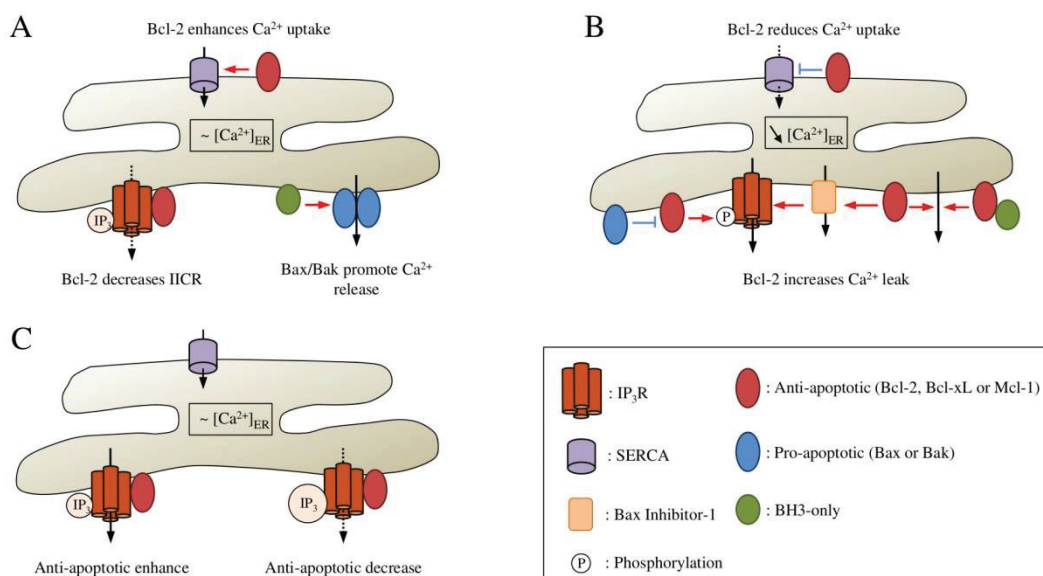


Fig. 1. Schematic representation of the different models for Bcl-2 family activity on ER Ca^{2+} homeostasis. (A) In this model, Bcl-2 reduces cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ to prevent apoptosis induction. Bcl-2 could act either by increasing SERCA activity or by reducing IICR. Bcl-2 may exert its inhibitory activity on IP_3R via a direct interaction with the modulatory and transducing domain of the receptor. Conversely, activated Bax and Bak are proposed to induce Ca^{2+} release from the ER. (B) In this model, Bcl-2 reduces ER Ca^{2+} content to prevent massive Ca^{2+} release which could trigger apoptosis. Bcl-2 is proposed to increase Ca^{2+} leak from the ER by promoting IP_3R phosphorylation or by directly inducing Ca^{2+} leak alone or in combination with a BH3-only protein. Bcl-2 could also reduce SERCA activity by a direct interaction. Bax and Bak may counteract the effect of Bcl-2 by a direct inhibitory interaction. Finally, Bcl-xL could act on BI-1 to increase Ca^{2+} leak from the ER with BI-1 acting as a Ca^{2+} channel or as an IP_3R sensitizer. (C) In this model, anti-apoptotic proteins promote survival by enhancing ER-mitochondria coupling. They are proposed to enhance IICR at low $[\text{IP}_3]$ to stimulate bioenergetics whereas at high $[\text{IP}_3]$ they could prevent apoptosis by reducing IICR. This effect may be mediated by a direct interaction with the C-terminus of IP_3R . Dashed lines represent a reduction of the calcium flux. Bold lines represent an increase of the calcium flux. Red and blue arrows represent activation and inhibition respectively. IP_3R : inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; SERCA: sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; BI-1: Bax-inhibitor-1; IICR: IP_3 -induced calcium release.

reduction of cytosolic Ca^{2+} level either by increasing ER Ca^{2+} load or by reducing Ca^{2+} release from the ER (Fig. 1A).

Nevertheless, in 2000 a new mechanism of action for Bcl-2 at the ER emerged when two groups showed that Bcl-2 was able to decrease ER Ca^{2+} content [47,48]. In their study, Pinton and colleagues demonstrated that Bcl-2 overexpression reduces IP_3 -induced Ca^{2+} release (IICR) and attributed this effect to a lower ER Ca^{2+} content due to increased Ca^{2+} leak from the ER [52]. Surprisingly, the authors did not observe any variation in cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ despite the detection of decreased mitochondrial Ca^{2+} uptake. Foyouzi-Youssefi and colleagues also described a reduced ER Ca^{2+} content in Bcl-2 overexpressing cells [53]. As ER $[\text{Ca}^{2+}]$ decrease is a signal for capacitative Ca^{2+} entry, authors showed that Bcl-2 enhances unstimulated Ca^{2+} influx and then induced elevated basal cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$. As for the previous study, it was shown that decreased ER $[\text{Ca}^{2+}]$ is a consequence of increased Ca^{2+} leak from the ER rather than Ca^{2+} uptake reduction. In both cases authors argued that formation of a cation-selective channel by Bcl-2 may be responsible for the increased Ca^{2+} leak (Fig. 1B). Two subsequent studies also concluded that Bcl-2 could decrease ER Ca^{2+} content. In the first it was demonstrated that Bcl-2 overexpression increases Ca^{2+} leak but also downregulates SERCA and Calreticulin expression to reduce ER Ca^{2+} content [54]. In the second, using a new genetically-encoded Ca^{2+} sensor, Palmer and colleagues measured $[\text{Ca}^{2+}]$ within the ER lumen. They found that Bcl-2 decreases ER Ca^{2+} content and, as a consequence, alters IICR [55].

In this model it was proposed that reduction of Ca^{2+} level within the ER mediates the anti-apoptotic activity of Bcl-2 by reducing the amount of releasable Ca^{2+} available to induce apoptosis. Foyouzi-Youssefi and colleagues also speculated that the increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ they

observed could promote cell survival by the CaMKK-dependent phosphorylation of Bad.

However, the idea according to which this effect is mediated by Bcl-2 pore formation was challenged when Chami and colleagues showed that a Bcl-2 chimera protein containing the pore domain of Bax has the same effect on ER Ca^{2+} homeostasis as the wild-type Bcl-2 [56]. Another possible mechanism emerged from a study which showed that, in contrast to what was proposed earlier, Bcl-2 can interact with and destabilize SERCA [57] (Fig. 1B). Another idea was further put forward to explain the reduction of ER Ca^{2+} content by Bcl-2. In their study, Bassik and colleagues proposed that Bcl-2 phosphorylation within an unstructured loop between its BH4 and BH3 domains can modulate its ability to decrease ER Ca^{2+} content [58]. They showed that in cells expressing a non-phosphorylatable mutant of Bcl-2 (Bcl-2 AAA) the ER Ca^{2+} level is lower than in Bcl-2 expressing cells due to higher Ca^{2+} leak. In this regard Bcl-2 AAA is more efficient at protecting cells from Ca^{2+} -dependent apoptotic stimuli than the wild-type protein. At last, they demonstrated that phosphorylation of Bcl-2 impairs its interaction with Bax and BH3-only proteins and provided evidence suggesting that Bcl-2 interaction with the BH3-only proteins was required to promote the reduction of ER Ca^{2+} content (Fig. 1B). However how a complex between Bcl-2 and a BH3-only can induce Ca^{2+} leak through the ER membrane is not discussed and remains elusive.

Finally, it has been proposed that Bax Inhibitor-1 (BI-1) may be the downstream target of Bcl-xL to lower ER $[\text{Ca}^{2+}]$. Indeed, Xu and colleagues demonstrated that BI-1 is required for ER calcium content reduction induced by Bcl-xL overexpression [59] (Fig. 1B). BI-1 was shown to increase calcium leak from the ER in a pH-dependent

manner [60] and it may act either by forming a Ca^{2+} -permeable channel pore with its C-terminus [61] or by interacting with IP_3R to sensitize the channel to low $[\text{IP}_3]$ [62].

Thus, so far, the molecular mechanism by which Bcl-2 can reduce Ca^{2+} level within the ER is still a matter of debate and should be further investigated.

Finally, the group of C.W. Distelhorst proposed that Bcl-2 could regulate calcium homeostasis at the ER by directly interacting with IP_3R . In a work published in 2004 they demonstrated that Bcl-2 is able to decrease IICR without affecting ER calcium level. In a convincing manner they showed that Bcl-2 directly interacts with IP_3R , forming a complex with the receptor. As a consequence, they described that Bcl-2 is able to reduce the channel open probability of IP_3R [63]. These results were confirmed by another study where the authors notably showed that ER-targeted Bcl-2 has the same effect as wild-type Bcl-2 on Ca^{2+} homeostasis [64]. Interaction between Bcl-2 and IP_3R was further characterized and it was demonstrated that Bcl-2 binds to the modulatory and transducing domain of IP_3R between the residues 1347–1426 in the middle of the protein [65] (Fig. 1A). Furthermore, Bcl-2 interacts with IP_3R via its BH4 domain and it has been shown that the BH4 domain alone was sufficient to decrease IICR [66]. At last, a recent study comparing the BH4 domains of Bcl-2 and Bcl-xL has identified a crucial residue within Bcl-2 which seems essential for its regulatory activity on IICR [67]. Contrary to Bcl-2, the BH4 domain of Bcl-xL was able neither to bind to the modulatory and transducing domain nor to reduce Ca^{2+} release through IP_3R . The authors found the Lys17 residue of Bcl-2 to be critical for the activity of Bcl-2 on IP_3R since its mutation in aspartate, as in the BH4 domain of Bcl-xL, abolishes the activity of Bcl-2 BH4 domain on Ca^{2+} signaling.

However, Bcl-xL was also shown to interact with IP_3R but at a different site as it binds the C-terminus of IP_3R . This interaction was shown to sensitize IP_3R to low concentrations of IP_3 thus enhancing Ca^{2+} oscillation in the cytosol. IP_3R sensitization stimulates mitochondrial bioenergetics allowing the authors to propose that Bcl-xL could promote survival by enhancing ER-mitochondria coupling and cellular metabolism [68]. In this case, Bcl-xL was also reported to decrease ER Ca^{2+} content but this effect does not seem to be relevant. Indeed, the same team showed two years later that Bcl-xL interacts with the three IP_3R isoforms but reduces ER Ca^{2+} content only in cells expressing $\text{IP}_3\text{R}3$. However, Bcl-xL sensitizes all IP_3R isoforms to IP_3 and enhances cytosolic Ca^{2+} oscillation and apoptosis resistance whatever isoform is expressed [69]. Therefore it is more likely that Bcl-xL action is mediated rather by its interaction with IP_3R than by decreasing ER Ca^{2+} content (Fig. 1C).

These differences between Bcl-xL and Bcl-2 could be attributed, as exposed above, to the differences between the BH4 domains of these proteins. Thus, depending on their BH4 domain, anti-apoptotic members could interact at different sites within IP_3R thus regulating the channel activity in a different manner (for extensive discussion on the topic see [70]).

Nevertheless, Bcl-2 and Mcl-1 seem also able to bind to the C-terminus region of IP_3R and to regulate Ca^{2+} homeostasis in a manner similar to Bcl-xL highlighting the complexity of Bcl-2 family mediated regulation of IP_3R [71,72] (Fig. 1C).

3.2. Regulation by pro-apoptotic members

Pro-apoptotic proteins are also able to localize at the ER and act on ER Ca^{2+} homeostasis. In 2001, Pan and colleagues first proposed a link between Bax and ER Ca^{2+} signaling since apoptosis induced by overexpression of Bax in CHO cells was correlated to a depletion of ER Ca^{2+} store [73]. However they argued that the depletion of the ER Ca^{2+} store rather than cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ increase is responsible for apoptosis induction in their model. The year after Bax and Bak were shown to localize at the ER where they induce ER Ca^{2+} depletion and

subsequent cytochrome c release due to Ca^{2+} accumulation in the mitochondria [74]. Bax seems to be required to induce Ca^{2+} -dependent apoptosis as Bax-null cells did not elicit ER Ca^{2+} pool reduction and subsequent apoptosis induced by the staurosporine [75]. Moreover, the group of C. Thompson found that ER stress can induce Bax and Bak oligomerization at the ER leading to caspase-12 activation [76]. Interestingly, they showed that the targeted expression of Bak was sufficient to trigger ER Ca^{2+} depletion and subsequent caspase-12 activation even in the absence of endogenous Bax and Bak. A more recent study is consistent with an activity of Bak at the ER as it was shown that ER-targeted Bak is able to activate BH3-only proteins and subsequent cytochrome c release in part via ER Ca^{2+} release [77]. All these studies therefore assess that once activated Bax and Bak could trigger Ca^{2+} release from the ER to induce apoptosis (Fig. 1A). However, as for the anti-apoptotic proteins contradictory results concerning the role of pro-apoptotic proteins at the ER exist. Indeed, the group of S. Korsmeyer found that in MEF cells deficient for Bax and Bak, ER Ca^{2+} content was significantly reduced suggesting that Bax and Bak act at the ER by increasing $[\text{Ca}^{2+}]$ in the lumen of the ER [78]. A few years later, they proposed a model to explain the effect of Bax and Bak on ER Ca^{2+} content. They showed that in cells lacking Bax and Bak $\text{IP}_3\text{R}1$ is hyperphosphorylated on Ser 1755. This PKA-dependent phosphorylation renders IP_3R sensitive to basal IP_3 concentration thus increasing Ca^{2+} leak from the ER. They also found that in the absence of Bax and Bak the interaction between Bcl-2 and IP_3R was enhanced and that bcl-2 knockdown reduces IP_3R phosphorylation in these cells [79]. So this group proposed that at the ER, Bcl-2 might induce IP_3R phosphorylation thus promoting Ca^{2+} leak and ER Ca^{2+} content reduction whereas Bax and Bak, by interacting with Bcl-2, could counteract IP_3R phosphorylation (Fig. 1B).

Finally, besides the multidomain proteins of the Bcl-2 family, the BH3-only protein Bik is also localized at the ER, thanks to its C-terminus TM domain, where it can induce cytochrome c release from the mitochondria [80]. Surprisingly, in this first study the authors argued that Ca^{2+} was not involved in this process. However, in a more recent study, they showed that Bik can induce Ca^{2+} release from the ER by promoting Bax and Bak localization and oligomerization at the ER [81] (Fig. 1A).

At the light of these conflicting results, it is difficult to decipher a common mechanism of action for the Bcl-2 family at the ER. Differences in the cell models as well as the detection methods used by the different groups should be taken into account explaining partially the divergence in the proposed models. Despite these discrepancies, it remains clear that multiple members of Bcl-2 proteins may act as key regulators of calcium homeostasis at the ER. Indeed, all studies at least agree on the fact that anti-apoptotic proteins are able to reduce the amount of calcium released from the ER upon apoptotic stress whereas pro-apoptotic has the opposite effect.

4. Regulation of mitochondrial Ca^{2+} homeostasis by Bcl-2 proteins

Although ER is the main store of Ca^{2+} in the cell, mitochondria also play a critical role in Ca^{2+} homeostasis. As mentioned in Section 2, mitochondria can rapidly uptake Ca^{2+} present in the cytosol acting as a buffer when cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ increases. In mitochondria Ca^{2+} enhances substrate uptake, the rate of NADH production and the activity of the ATP synthase as well as those of the pyruvate, ketoglutarate and isocitrate dehydrogenases of the TCA cycle thus promoting mitochondrial metabolism and ATP production [82]. However, Ca^{2+} overload is detrimental as it impairs mitochondrial respiration and leads to membrane potential drop, mitochondria swelling and finally cytochrome c release. Thus, given the role of the Bcl-2 family on the control of cell fate it can be assumed that this group of proteins can also modulate Ca^{2+} homeostasis directly at the mitochondria. Indeed, several studies have revealed that Bcl-2 proteins could act

on mitochondrial Ca^{2+} homeostasis although, like at the ER, no consensus exists concerning the mechanisms underlying this function (Fig. 2).

The first evidence for a role of Bcl-2 on mitochondrial Ca^{2+} homeostasis was provided in a study on neural cells. In this model, it was shown that overexpression of Bcl-2 allows mitochondria to uptake more Ca^{2+} without any mitochondrial respiratory impairment suggesting that Bcl-2 can protect mitochondria from Ca^{2+} overload [83]. Similar results showing that Bcl-2 enhances the capacity of mitochondria to store Ca^{2+} were obtained by two other groups [45,50,84]. One of these further showed that Bcl-2 in fact induces a reduction of mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger activity leading to decreased Ca^{2+} efflux from the mitochondria [85] (Fig. 2A). However, other studies found that Bcl-2 had no effect on Ca^{2+} uptake by the mitochondria [58] or even decreases this process although excessive Bcl-2 amount could be detrimental for mitochondria [64].

Concerning the pro-apoptotic members, only few cases depict a role in mitochondrial Ca^{2+} homeostasis. For instance, it has been shown that Bax can enhance cytochrome c release induced by Ca^{2+} on isolated mitochondria suggesting that Bax may contribute to Ca^{2+} entry in this organelle [86]. Another study also concluded that Bax and Bak increase $[\text{Ca}^{2+}]$ within mitochondria [74] (Fig. 2B). On the contrary it has also been proposed that Bax can promote Ca^{2+} release from the mitochondria to induce Ca^{2+} waves in the cell and then enhance the apoptotic response [87] (Fig. 2A).

So far, the mechanism by which Bcl-2 family members can act on mitochondrial Ca^{2+} homeostasis is still unknown. As at the ER it can be speculated that the channel properties of the Bcl-2 proteins could be implicated in this function, although Bcl-2 and Bcl-xL channels seem more permeable to monovalent cations and Bax and Bak channel to monovalent anions [88]. One other interesting hypothesis emerged from the fact that Bcl-2 proteins have been shown to interact with VDAC. This channel is the most abundant protein of the OMM and is now acknowledged to be responsible for the import of Ca^{2+} across the OMM [89]. VDAC can be found in two states, an open state where it is mainly permeable to anions and metabolites and a closed state where cations, and in particular Ca^{2+} , could freely permeate the channel [90,91]. The first study reporting such interaction demonstrated that Bcl-xL, Bax and Bak are able to bind to VDAC. While Bcl-xL closes VDAC, Bax and Bak on the contrary promote VDAC opening [92]. The year after, the same group showed that the BH4 domain of Bcl-xL and Bcl-2 was required for exerting their inhibitory effect on VDAC opening [93]. Surprisingly, in this paper authors showed that Bcl-xL could inhibit loss of membrane potential and

cytochrome c release from isolated mitochondria submitted to a high $[\text{Ca}^{2+}]$. Therefore, if Bcl-xL promotes VDAC closure it can be assumed that it promotes Ca^{2+} entry into mitochondria and thus may not prevent apoptosis in this case. This group also showed that the BH3-only protein Bim could also interact with VDAC and promote its opening [94]. Another recent study also concluded that Bcl-xL could promote VDAC closure via an interaction with the N-terminus domain of the channel [95]. Thus, in this model, anti-apoptotic proteins might enhance Ca^{2+} entry into mitochondria whereas pro-apoptotic proteins might inhibit it (Fig. 2A). However this proposal does not fit the largely accepted idea of Ca^{2+} -sensitive mitochondrial PTP opening. According to this model one could postulate that pro-apoptotic should enhance Ca^{2+} entry into mitochondria to promote cell death and then promote the closure of VDAC. Of note, it has been shown that promoting the closed state of VDAC accelerates the Ca^{2+} -induced PTP opening [96]. More consistent with the Ca^{2+} -sensitive PTP opening, Bcl-xL was shown to promote the open state of VDAC [97] while the BH3-only tBid on the contrary was proposed to close the channel [98]. In addition, Bcl-xL specifically targeted to the mitochondria was shown to be sufficient to protect cells from apoptosis induced by Ca^{2+} -dependent stresses such as H_2O_2 treatment suggesting it may prevent Ca^{2+} entry into mitochondria through VDAC [99]. Moreover, a recent study has implicated VDAC in Ca^{2+} -dependent death induced by Bad [100]. In this paper, Roy and colleagues showed that upon ceramide and staurosporine treatment Bad was dephosphorylated to induce apoptosis independently of Bax and Bak. Apoptosis in this case relies on Ca^{2+} and is triggered by the Ca^{2+} -dependent PTP opening. Interestingly, in these conditions, Bad targets Bcl-xL at the mitochondria and reduces its interaction with VDAC. Thus by breaking Bcl-xL/VDAC interaction Bad may promote VDAC closure and then Ca^{2+} entry into the mitochondria to induce PTP opening (Fig. 2B).

Through all these studies it appears that the exact role of Bcl-2 proteins on VDAC regulation remains largely unclear. Moreover, results presented here provide only indirect clues for an implication of the Bcl-2 family of proteins on mitochondrial Ca^{2+} homeostasis via VDAC regulation. Taking into account that VDAC is also proposed to participate in apoptosis by forming pores in the OMM alone or in combination with Bax to induce cytochrome c release [101], it becomes particularly difficult to decipher the mechanism of action of Bcl-2 proteins on VDAC activity as they can probably act on both VDAC oligomerization and Ca^{2+} fluxes through the channel. Nevertheless, given the importance of Ca^{2+} signaling in mitochondria it can be of particular interest to look directly at the ability of Bcl-2 proteins to control Ca^{2+} homeostasis in this organelle.

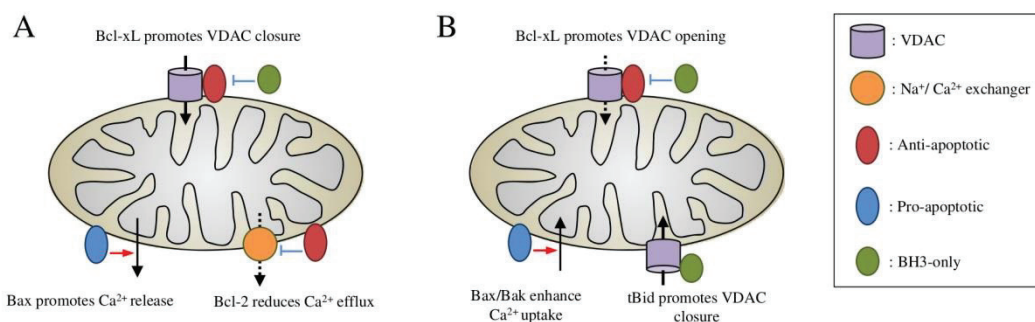


Fig. 2. Schematic representation of the different models for Bcl-2 family activity on mitochondrial Ca^{2+} homeostasis. (A) In this model, anti-apoptotic members increase the mitochondrial capacity to uptake Ca^{2+} . Bcl-2 could reduce the activity of the mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and Bcl-xL could promote VDAC closure suggesting it may increase Ca^{2+} entry into the mitochondria. Conversely, Bad may induce VDAC opening whereas Bax may promote Ca^{2+} release from the mitochondria to amplify apoptotic response. (B) In this model, anti-apoptotic members prevent mitochondrial Ca^{2+} overload. Bcl-xL could promote VDAC opening suggesting it may reduce Ca^{2+} entry. Conversely, tBid may induce VDAC closure and Bax/Bak may promote mitochondrial Ca^{2+} uptake. Dashed lines represent a reduction of the calcium flux. Bold lines represent an increase of the calcium flux. Red and blue arrows represent activation and inhibition respectively. VDAC: Voltage Dependent Anion Channel.

5. Calcium in non-apoptotic functions of Bcl-2 family

Beyond their role in apoptosis, there is a growing body of evidence suggesting that Bcl-2 proteins are involved in numerous other cellular processes. However, the mechanisms allowing Bcl-2 proteins to exert their non-apoptotic functions are poorly understood. Here, we will discuss the implication of the regulatory activity of Bcl-2 proteins on Ca^{2+} homeostasis as a possible mechanism for such functions (Table 1).

5.1. Cell cycle

The cell cycle is the process by which cells divide through a series of events leading to DNA replication and cytokinesis. Cell cycle is divided in four phases, the G1 phase, the S phase, the G2 phase (collectively forming the interphase) and the mitosis (M phase). Between the end of mitosis and the G1 phase, cells can enter a quiescent state, known as the G0 phase, where they stop dividing. At the molecular level, the cell cycle is mainly regulated by Cyclin and Cyclin-dependent kinases (CDK) that associate in a specific manner to drive the different phases of the cell cycle.

The implication of Bcl-2 in the cell cycle was quickly suggested after its discovery as in the absence of IL-3 Bcl-2 overexpressing cells not only delayed the onset of apoptosis but are also arrested in G1 phase [4]. Further investigations confirmed this implication of Bcl-2 in cell cycle control. In particular, it has been shown that Bcl-2 deficient cells have an accelerated cell cycle while Bcl-2 overexpression retards the G0/S transition [102]. This was correlated to an increased level of the CDK inhibitor p27 and a downregulation of the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) activity. Bcl-xL has the same effect on the cell cycle [103] and it has been confirmed that the effect of anti-apoptotic proteins on the cell cycle is mediated by elevation of p27 level and subsequent inhibition of the CDKs required for G1 phase progression [104]. This effect can be counteracted by Bax and Bad [103,105]; conversely Bax overexpression promotes S phase entry due to lower level of p27 [106]. Thus, anti- and pro-apoptotic exert opposite effects on the cell cycle at least in part by controlling p27 level. However, it has been shown that the anti-apoptotic function of Bcl-2 is independent from its action on the cell cycle. Indeed, mutation of a tyrosine in the BH4 domain of Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-W has no effect on their ability to bind pro-apoptotic members and prevent apoptosis whereas it abolishes their effect on

the cell cycle [107]. Interestingly, this mutation seems also to perturb the ability of Bcl-2 to decrease IICR [67]. Of note, reduction of ER Ca^{2+} level also induced an arrest in G1 phase correlated with increased p27 level [108]. Consistent with this result, Bax/Bak deficient cells, known to have lower ER Ca^{2+} content, exhibit higher level of p27 and are slower to enter S phase compared to normal cells [109]. Finally, inhibition of the Ca^{2+} -dependent proteins Calmodulin, Calmodulin-dependent kinases (CaMK) and Calcineurin could also lead to cell cycle arrest early in G1 phase indicating that these proteins may be involved in cell cycle progression through the G1 phase [110,111]. In particular, it has been shown that CaMKII can activate the MEK/ERK pathway to promote p27 phosphorylation on the Thr187, a signal for its degradation by the proteasome [112]. Furthermore, Calcineurin is known to trigger NFAT dephosphorylation inducing its translocation to the nuclei and Bcl-2 overexpression decreases NFAT activity. Thus, Bcl-2 and Bcl-xL may reduce the amount of Ca^{2+} released from the ER by either decreasing ER Ca^{2+} content or directly interacting with IP₃R. As a consequence Bcl-2 and Bcl-xL could prevent the activation of Ca^{2+} -dependent proteins resulting in cell cycle arrest whereas pro-apoptotic proteins would exert the opposite effect.

Interestingly, Bcl-2 appears to be phosphorylated in a cell cycle dependent manner. Indeed, Bcl-2 was found to be phosphorylated during mitotic arrest induced by paclitaxel and decreasing Bcl-2 phosphorylation in cells arrested in mitosis promoted interphase re-entry [113]. It has further been shown that such phosphorylation normally occurs in mitosis when cyclinB1/CDK1 activity peaks although this complex is not able to directly phosphorylate Bcl-2 [114]. Furthermore, phosphorylation of Bcl-2 was proposed to occur in G2/M transition via the ASK1/JNK pathway, Bcl-2 being phosphorylated on Ser70, Ser87 and Thr69 by JNK [115]. Of note, as mentioned in Section 3.1, phosphorylation of Bcl-2 on these residues was reported to act on ER Ca^{2+} homeostasis, as illustrated by the fact that a non-phosphorylatable Bcl-2 mutant decreases Ca^{2+} released from the ER [58]. Thus it can be assumed that phosphorylation of Bcl-2 could increase cytosolic Ca^{2+} concentration during the G2/M transition and mitosis. On the other hand, there is a large body of evidence showing that CaMKII activity is essential for progression through the G2 and M phases of the cell cycle [111]. So, a plausible hypothesis might be that phosphorylation of Bcl-2, by increasing Ca^{2+} release from the ER, could participate in CaMKII activation thus promoting cell cycle progression.

Table 1

Table summarizing the non-apoptotic functions of the Bcl-2 family, their effect on Ca^{2+} homeostasis, intermediate effectors involved in these pathways and finally the subsequent effect on cellular processes.

Non-apoptotic function	Bcl-2 family member involved	Effect on $[\text{Ca}^{2+}]_c$	Intermediate effectors	Effect	References
Cell cycle	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W	$\searrow [\text{Ca}^{2+}]_c$	\searrow CaMK activity \nearrow p27 level \searrow Calcineurin activity \searrow NFAT dependent transcription	Arrest in G1	[4,90–92,95]
	Bax, Bak	$\nearrow [\text{Ca}^{2+}]_{ER}$ $\nearrow [\text{Ca}^{2+}]_c$	\nearrow CaMK activity \searrow p27 level	Faster G1	[91,93,94]
Neuroplasticity	Phosphorylated Bcl-2 Bcl-2	$\nearrow [\text{Ca}^{2+}]_c$ $\searrow [\text{Ca}^{2+}]_{ER}$ $\nearrow [\text{Ca}^{2+}]_c$	\nearrow CaMKII activity \nearrow CaMK activity \nearrow CREB and Erk dependent transcription \nearrow c-fos expression \nearrow Calcineurin activity	G2/M progression Neurite growth	[101–103] [109–114,116,117]
Immune response	Bim Bax, Bak	$\nearrow [\text{Ca}^{2+}]_c$ $\nearrow [\text{Ca}^{2+}]_{ER}$ \nearrow IICR	\nearrow Calcineurin activity	Lymphocyte activation	[127] [129]
Cell migration and invasion	Bcl-2	$\nearrow [\text{Ca}^{2+}]_c$	\nearrow NFAT dependent transcription \nearrow CaMK activity \nearrow AP1 and NF- κ B dependent transcription \nearrow MMP-2/9 expression	Cell invasion	[131–134,136,137]
Early embryonic development	Mcl-1 Nr2	$\nearrow [\text{Ca}^{2+}]_c$ $\searrow [\text{Ca}^{2+}]_c$	\nearrow Calmodulin activity \searrow MLCK activity \searrow Actin-myosin contraction	Embryo implantation Epiboly progression	[140] [151,153]

5.2. Neural plasticity

Neural plasticity, also known as neuroplasticity, refers to the changes in structure, function and organization of the neuronal network. This phenomenon has long been thought to be restricted to the developing nervous system but it is now accepted that it occurs in processes such as learning or memory as well as in recovery after brain injury. Neuroplasticity is driven in part by the formation of new synapses and thus requires the extension of neurites to reach and form these new synapses.

Bcl-2 and Bcl-xL are expressed in the nervous system during embryonic development as well as during the whole lifespan but they harbor different spatial and temporal patterns of expression. Bcl-2 and Bcl-xL are both expressed in the developing central nervous system (CNS). However, postnatally, Bcl-xL expression increases in the CNS while Bcl-2 expression is reduced with aging, being almost restricted to the peripheral nervous system (PNS) [116,117]. While *bcl-x* knockout mice exhibit massive death of developing neurons followed by embryonic death at day 13 [118], *bcl-2* knockout mice do not show any reduction in neuron number following the period of naturally occurring cell death [119], suggesting that Bcl-xL is the main regulator of neuronal apoptosis. On the other hand, it has been shown that Bcl-2 can promote neurite outgrowth and regeneration suggesting that Bcl-2 may play a role in neuroplasticity. Consistently, Bcl-2 is strongly expressed in the developing CNS when axons elongate and its expression declines as neurons lose their ability to generate new axons [120]. In adults its expression is maintained in regions where postnatal neurogenesis takes place, such as the dentate gyrus of the cortex [116]. Thus, a number of studies have demonstrated that Bcl-2 overexpression in CNS neurons promotes axonal growth [121] while axonal elongation is reduced in neurons from Bcl-2-deficient mice [122,123]. Interestingly, Jiao and colleagues demonstrated that the effect of Bcl-2 on axon elongation is dependent on its ER localization and is mediated by the activation of Erk and CREB transcriptional programs [124]. These programs appear to be essential for the regulation of neurite extension and it is well established that they can be activated by cytosolic $[Ca^{2+}]$ increase, in part via CaMKs-dependent phosphorylation [125]. These authors showed that in neurons, Bcl-2 reduces ER Ca^{2+} uptake, probably by acting on SERCA, to enhance cytosolic Ca^{2+} level and then promote axon elongation. Consistent with this result, measurement of intracellular Ca^{2+} store content in PC12 cells by another group also revealed that Bcl-2 decreases ER uptake, suggesting that, in CNS neurons, Bcl-2 may increase cytosolic Ca^{2+} level to promote axon elongation [84]. Furthermore, another publication strengthens the idea that Bcl-2 mediates axon elongation through CREB activation as Bcl-2 could increase *c-fos* gene expression, one of the target genes of CREB required for axonal elongation [126]. Finally, the effect of Bcl-2 on Ca^{2+} homeostasis may have a number of other consequences than CREB activation as many components of the machinery required for axonal elongation are Ca^{2+} -sensitive [127]. In contrast with the results in CNS neurons, Hansen and colleagues found that Bcl-2 overexpression in spiral ganglion neurons inhibits neurites outgrowth [128]. Moreover, in a later study, they showed that this effect could be triggered by Bcl-2 targeted either at the ER or at the mitochondria [129]. The authors argued that this difference could rely on the fact that each type of neuron has a different optimal intracellular $[Ca^{2+}]$ required to promote neurite growth [127]. Thus, in spiral ganglion neuron, Bcl-2, by acting on Ca^{2+} homeostasis at both ER and mitochondria, may alter the intracellular $[Ca^{2+}]$ in a way that inhibits neurite growth.

Of note, neural plasticity seems to be impaired in some pathologies such as anxiety or bipolar disorders and some studies reveal that Bcl-2 may be related to these pathologies [130,131]. In particular, bipolar disorder is associated with perturbations in intracellular Ca^{2+} homeostasis and it was recently showed that a single nucleotide

polymorphism (SNP), which decreases Bcl-2 expression, is associated with bipolar disorder [132,133]. Both studies demonstrate that this SNP leads to alterations in intracellular Ca^{2+} homeostasis associated with abnormal Ca^{2+} release through IP₃R.

Thus, Bcl-2 appears to play a crucial role in neuroplasticity although the underlying mechanism is unclear. However, Bcl-2 seems to be implicated in the tight regulation of Ca^{2+} fluxes required for neurite elongation by acting at the ER, on both IP₃R and SERCA, but also possibly at the mitochondria.

5.3. Lymphocyte activation

Ca^{2+} is a crucial second messenger for lymphocyte activation and proliferation following antigen binding to the T-Cell receptor (TCR) or B-Cell receptor (BCR) [134]. Indeed, antigen binding on TCR and BCR, forming the immune synapse, first leads to IP₃ generation and subsequent Ca^{2+} release through IP₃R. This release induces depletion of the ER Ca^{2+} store and then promotes the influx of extracellular Ca^{2+} through the opening of the plasma membrane Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channels (CRAC) by a pathway commonly referred to as store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) [134,135]. It has also been shown that mitochondria play a fundamental role in intracellular Ca^{2+} homeostasis after immune synapse formation by moving to the plasma membrane and uptaking some amount of Ca^{2+} to prevent high cytosolic $[Ca^{2+}]$ which leads to CRAC inactivation [136,137]. Finally, this fine intracellular Ca^{2+} regulation leads, among other, to the activation of Calcineurin which dephosphorylates and activates NFAT, a critical step for T-cell activation and proliferation.

Beyond their known function in lymphocyte selection and development by controlling apoptosis [138], Bcl-2 proteins might be involved in Ca^{2+} homeostasis regulation in the immune cells thanks to their ER and/or mitochondria localization. Indeed, recent studies pointed out the role of Bcl-2 proteins in Ca^{2+} release from the ER after T cell receptor activation. Thus the BH3-only protein, Bim, was shown to be crucial for T-cell activation and proliferation [139]. In this study authors demonstrated that T-cells from Bim^{-/-} mice exhibit lower ER Ca^{2+} release and subsequent NFAT dephosphorylation. These severe defects seem to be correlated with an increase of the Bcl-2/IP₃R complex number, leading to partial ER depletion because of the suppression of Bim destabilization effect on Bcl-2/IP₃R interaction. Also, a second team has shown that Bcl-2 could modulate Ca^{2+} release from the ER after strong T-cell activation, but not weak activation, suggesting that Ca^{2+} responses may have different requirements for the IP₃R [140]. Thus, it is possible that Bcl-2 might be implicated in these two different regulation pathways.

Moreover, the group of C. Thompson nicely demonstrated the non-apoptotic role of Bax and Bak in the control of T-cell proliferation by their ability to regulate ER Ca^{2+} release after TCR engagement [141]. Their data indicated that T-cells lacking both Bax and Bak display defects in TCR- and IP₃-inducible Ca^{2+} fluxes from the ER. They argued that decreased IICR is a consequence of ER Ca^{2+} store reduction in Bax^{-/-} Bak^{-/-} T cells. They also showed that Ca^{2+} deregulation leads to a decrease of ROS production which could also be involved in T-cell proliferation.

Finally, another group demonstrated that Bcl-2 could regulate plasma membrane Ca^{2+} ATPases (PMCA) function in pancreatic acinar cells [142]. PMCA has a fundamental role in Ca^{2+} homeostasis control near the CRAC after lymphocyte activation, avoiding CRAC inactivation and thus permitting the SOCE process. We may then hypothesize that during TCR activation, Bcl-2 might also regulate Ca^{2+} extrusion by modulating PMCA function in T-cells.

Thus many studies have provided evidence that Ca^{2+} is crucial for lymphocyte activation with the ER and the mitochondria playing central roles. Given their ability to interact with IP₃R and VDAC, Bcl-2 proteins might be important for IICR and mitochondrial Ca^{2+} buffering during lymphocyte activation.

5.4. Cell migration and invasion

The deregulation of Bcl-2 family protein expression is often associated with cell transformation as it allows tumor cells to escape from apoptosis. However, some studies provide evidence that Bcl-2 proteins can also regulate cellular migration and invasion during tumor progression. It was first reported that the overexpression of Bcl-2 enhances the metastatic potential of breast cancer cell line in vivo and promotes cell migration and invasion in vitro [143]. Bcl-2 was further found to exert the same effect in human glioma malignant cell line; this effect was attributed to an increased level of matrix metalloproteinases (MMP) and in particular MMP-2 and MMP-9 [144]. MMPs are able to cleave components of the extracellular matrix and are associated with tumor progression as they can degrade the basement membrane allowing cells to form metastasis [145]. These results were confirmed in non-small cell lung cancer cells where Bcl-2 also promotes MMP-2 expression and activity [146]. These authors demonstrated that induction of MMP-2 expression is driven here by the AP-1 transcription factor. Interestingly, it has been proposed that elevation of intracellular Ca^{2+} level can promote AP-1 formation via CaMK activation [147]. Thus Bcl-2 either by increasing Ca^{2+} leak at the ER or by reducing Ca^{2+} uptake at the ER and/or at the mitochondria could promote Ca^{2+} increase in the cytosol and subsequent activation of the AP-1 transcriptional complex. Furthermore, two studies showed that Bcl-2 may also promote the activity of the NF- κ B transcription factor which can in particular induce MMP-9 expression [148,149]. As for AP-1 it has been reported that intracellular Ca^{2+} increase can activate NF- κ B [150]. Together these data suggest that Bcl-2 may promote the activation of transcriptional factors inducing expression of genes involved in migration and invasion of tumor cells by regulating Ca^{2+} homeostasis.

Finally, cell migration is tightly linked to a fine regulation of Ca^{2+} homeostasis within the cell. Indeed, it has been recently demonstrated that migration relies on Ca^{2+} gradients inside the cell which can activate a large number of Ca^{2+} -dependent proteins at the leading edge of the migrating cell [151]. Given, the role of Bcl-2 proteins on Ca^{2+} homeostasis it could be hypothesized that these proteins are differently regulated or expressed within the migrating cell to participate in the formation of Ca^{2+} gradients and thus act on cell migration.

5.5. Early embryonic development

Apoptosis is an essential phenomenon during embryonic development to control cellular homeostasis and shape the future body of the developing embryo. In this regard, Bcl-2 proteins are highly expressed during embryonic development and knockout of their related genes are generally correlated with apoptosis defects during embryogenesis [7]. However, some members of the family seem to exert alternative functions going from oocyte maturation to the control of early embryonic development.

In particular, *mcl-1* is one of the only members of the family which knockout in mice is not correlated with apoptosis defect. Indeed, it has been shown that *mcl-1* null embryos do not harbor any sign of increased apoptosis but these embryos fail to implant in utero and exhibit a delay of maturation [152]. Interestingly, IP_3 -dependent Ca^{2+} release has been proposed to participate in mouse pre-implantation development via the activation of Calmodulin [153]. In particular, decreasing the intracellular Ca^{2+} level within the embryo seems to delay the first steps of embryonic development. Moreover, during implantation the fixation of blastocyst with fibronectin induces a rise in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ and reducing the amount of intracellular Ca^{2+} during this process seems to impair implantation [154]. Furthermore, so far the only study on Ca^{2+} regulation by Mcl-1 proposed that it enhanced Ca^{2+} release through IP_3 R upon physiological IP_3 stimulation [71]. Thus, in the mouse embryo, absence of Mcl-1 may decrease Ca^{2+} release from the ER then altering development and implantation.

Among the anti-apoptotic members, orthologs of *nr-13* seem to be particularly important for reproduction and embryonic development. Nr-13 was first characterized as an anti-apoptotic protein in quail neuroretina. Interestingly, *nr-13* gene expression was shown to be enhanced by the Rous sarcoma virus thus contributing to virus expansion [155]. In chicken, Nr-13 was shown to be mainly expressed during embryonic development in the bursa of Fabricius and in ovarian follicles [156,157]. Later on, the mouse homolog, Diva/Boo [146] and the human homolog, Nr13 (also known as Bcl2l10) [158] were characterized. Of note, these two proteins are only expressed in ovaries and testis [159,160]. In the ovary, Bcl2l10 is implicated in oocyte maturation where it seems to control spindle formation, possibly by interacting with the microtubule-binding protein TCTP [159,161,162]. More recently, we have identified *nrz* as the zebrafish ortholog of *nr-13*. Nr13 is highly expressed during the early embryonic development with a specific pattern of expression [163]. Indeed, Nr13 is found in an extra-embryonic structure called the yolk syncytial layer (YSL), which results from the merging of marginal cells of the embryo with the yolk sac before the onset of gastrulation. Interestingly, Nr13 seems to be involved in the first morphogenetic movement of zebrafish embryogenesis called epiboly. This movement is characterized by the migration of embryonic cells from the animal pole down to the vegetal pole of the embryo. When *nrz* translation is repressed, embryos fail to undergo epiboly and finally die from a detachment of the cells from the yolk sac without any apoptosis activation [163,164]. Further characterization of this phenotype pointed out Ca^{2+} homeostasis alteration within the embryo [165]. Nr13 is in fact able to interact with IP_3 R and decrease Ca^{2+} release through the channel. Thus, in the absence of Nr13, a large increase in cytosolic Ca^{2+} level occurs during epiboly which activates the CaMK, MLCK. This cascade leads to the hypercontraction of an actin-myosin ring present at the margin of the migrating cells resulting in detachment of the whole embryo from the yolk cell. Interestingly, the normal actin-myosin ring contraction during epiboly is correlated with cyclic Ca^{2+} waves, which cross the embryo in the YSL [166]. Therefore, regarding the function of Nr13 at the ER and its impact on actin ring contraction, we could speculate that during epiboly progression Nr13/ IP_3 R interaction may be modulated to generate these Ca^{2+} waves [167].

6. Conclusion

For the last two decades, Bcl-2 proteins function in apoptosis regulation at the mitochondria has been extensively studied although certain mechanisms still remain unsolved. Moreover, it is now well established that Ca^{2+} , a second messenger crucial for many cellular processes, is also involved in apoptosis and numerous studies emphasize the role of Bcl-2 proteins on Ca^{2+} regulation in this process. However, the mechanisms by which Bcl-2 proteins could regulate Ca^{2+} homeostasis at both the ER and the mitochondria are poorly understood and are still a matter of debate.

Beyond their involvement in apoptosis, a growing set of evidence supports the idea that Bcl-2 proteins also possess non-apoptotic roles as different as cell cycle regulation or neuroplasticity among other. Here, we discussed the hypothesis according to which Ca^{2+} homeostasis regulation may be a common mechanism underlying some of these non-apoptotic functions of Bcl-2 proteins. Therefore, at the light of these evidences, a better understanding of the mechanisms by which Bcl-2 proteins control Ca^{2+} fluxes within the cell could allow us to decipher the large action range of this fascinating family.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Jonathan Lopez and Alexander Wood for their helpful advices on the manuscript.

References

- [1] Y. Tsujimoto, J. Crossman, E. Jaffe, C. Croce, Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma, *Science* 228 (1985) 1440–1443.
- [2] A. Bakhshii, J.P. Jensen, P. Goldman, J.J. Wright, O.W. McBride, A.L. Epstein, S.J. Korsmeyer, Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around Jh on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18, *Cell* 41 (1985) 899–906.
- [3] M.L. Cleary, S.D. Smith, J. Sklar, Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation, *Cell* 47 (1986) 19–28.
- [4] D.L. Vaux, S. Cory, J.M. Adams, Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells, *Nature* 335 (1988) 440–442.
- [5] D. Hockenbery, G. Nuñez, C. Millman, R.D. Schreiber, S.J. Korsmeyer, Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death, *Nature* 348 (1990) 334–336.
- [6] A. Aouacheria, F. Brunet, M. Gouy, Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-only, and Bnip families of apoptotic regulators, *Mol. Biol. Evol.* 22 (2005) 2395–2416.
- [7] R.J. Youle, A. Strasser, The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 47–59.
- [8] E. Chipuk, T. Moldoveanu, F. Llambi, M.J. Parsons, D.R. Green, The BCL-2 family reunion, *Mol. Cell* 37 (2010) 299–310.
- [9] A. Görlach, P. Klappa, T. Kietzmann, The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 1391–1418.
- [10] E. Szegezdi, D.C. Macdonald, T. Ni Chonghaile, S. Gupta, A. Samali, Bcl-2 family on guard at the ER, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296 (2009) C941–C953.
- [11] D. Rodriguez, D. Rojas-Rivera, C. Hetz, Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: the BCL-2 protein family rheostat, *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (2011) 564–574.
- [12] M. Høyer-Hansen, M. Jäättelä, Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 1576–1582.
- [13] T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B.A. Yankner, J. Yuan, Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta, *Nature* 403 (2000) 98–103.
- [14] T. Yoneda, K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama, M. Tohyama, Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 13935–13940.
- [15] T. Nakagawa, J. Yuan, Cross-talk between two cysteine protease families Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis, *J. Cell Biol.* 150 (2000) 887–894.
- [16] R.V. Rao, S. Castro-Obregon, H. Frankowski, M. Schuler, V. Stoka, G. del Rio, D.E. Bredesen, H.M. Ellerby, Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 21836–21842.
- [17] M. Chen, H. He, S. Zhan, S. Krajewski, J.C. Reed, R.A. Gottlieb, Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 30724–30728.
- [18] S. Gil-Parrado, A. Fernández-Montalván, I. Assfalg-Machleidt, O. Popp, F. Bestvater, A. Holloschi, T.A. Knoch, E.A. Auerswald, K. Welsh, J.C. Reed, H. Fritz, P. Fuentes-Prior, E. Spiess, G.S. Salvesen, W. Machleidt, Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 27217–27226.
- [19] S.R. Datta, A. Katsov, L. Hu, A. Petros, S.W. Fesik, M.B. Yaffe, M.E. Greenberg, 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation, *Mol. Cell* 6 (2000) 41–51.
- [20] H.G. Wang, N. Pathan, I.M. Ethell, S. Krajewski, Y. Yamaguchi, F. Shibasaki, F. McKeon, T. Bobo, T.F. Franke, J.C. Reed, Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD, *Science* 284 (1999) 339–343.
- [21] S. Yano, H. Tokumitsu, T.R. Soderling, Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway, *Nature* 396 (1998) 584–587.
- [22] G.C. Shore, J.R. Tata, Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. II. Cytoplasmic messenger RNA's which code for albumin and mitochondrial proteins are distributed differently between the two fractions, *J. Cell Biol.* 72 (1977) 726–743.
- [23] P.J. Meier, M.A. Spycher, U.A. Meyer, Isolation and characterization of rough endoplasmic reticulum associated with mitochondria from normal rat liver, *Biochim. Biophys. Acta* 646 (1981) 283–297.
- [24] J.E. Vance, Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 7248–7256.
- [25] T. Simmen, J.E. Aslan, A.D. Blagoveshchenskaya, L. Thomas, L. Wan, Y. Xiang, S.F. Feliciangeli, C.-H. Hung, C.M. Crump, G. Thomas, PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis, *EMBO J.* 24 (2005) 717–729.
- [26] O.M. de Brito, L. Scorrano, Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria, *Nature* 456 (2008) 605–610.
- [27] R. Rizzuto, M. Brini, M. Murgia, T. Pozzan, Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria, *Science* 262 (1993) 744–747.
- [28] R. Rizzuto, P. Pinton, W. Carrington, F.S. Fay, K.E. Fogarty, L.M. Lifshitz, R.A. Tuft, T. Pozzan, Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses, *Science* 280 (1998) 1763–1766.
- [29] G. Szabadkai, K. Bianchi, P. Várnai, D. De Stefani, M.R. Wieckowski, D. Cavagna, A.L. Nagy, T. Balla, R. Rizzuto, Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels, *J. Cell Biol.* 175 (2006) 901–911.
- [30] G. Csordás, P. Várnai, T. Golenár, S. Roy, G. Purkins, T.G. Schneider, T. Balla, G. Hajnóczky, Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface, *Mol. Cell* 39 (2010) 121–132.
- [31] J.M. Baughman, F. Perocchi, H.S. Girgis, M. Plovanich, C.A. Belcher-Timme, Y. Sancak, X.R. Bao, L. Strittmatter, O. Goldberger, R.L. Bogorad, V. Kotliansky, V.K. Mootha, Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter, *Nature* 476 (2011) 341–345.
- [32] D. De Stefani, A. Raffaello, E. Teardo, I. Szabò, R. Rizzuto, A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter, *Nature* 476 (2011) 336–342.
- [33] K. Mallilankaraman, P. Doonan, C. Cárdenas, H.C. Chandramoorthy, M. Müller, R. Miller, N.E. Hoffman, R.K. Gandhirajan, J. Molgó, M.J. Birnbaum, B.S. Rothberg, D.-O.D. Mak, J.K. Foskett, M. Madesh, MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cell survival, *Cell* 151 (2012) 630–644.
- [34] C. Giorgi, D. De Stefani, A. Bononi, R. Rizzuto, P. Pinton, Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1817–1827.
- [35] H. Sugawara, M. Kurosaki, M. Takata, T. Kurosaki, Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor, *EMBO J.* 16 (1997) 3078–3088.
- [36] T. Jayaraman, A.R. Marks, T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis, *Mol. Cell Biol.* 17 (1997) 3005–3012.
- [37] G. Szalai, R. Krishnamurthy, G. Hajnóczky, Apoptosis driven by IP₃-linked mitochondrial calcium signals, *EMBO J.* 18 (1999) 6349–6361.
- [38] S. Blackshaw, A. Sawa, A.H. Sharp, C.A. Ross, S.H. Snyder, A.A. Khan, Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates cell death, *FASEB J.* 14 (2000) 1375–1379.
- [39] G. Hajnóczky, G. Csordás, S. Das, C. García-Pérez, M. Saotome, S. Sinha Roy, M. Yi, Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis, *Cell Calcium* 40 (2006) 553–560.
- [40] S. Krajewski, S. Tanaka, S. Takayama, M.J. Schibler, W. Fenton, J.C. Reed, Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncogene: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes, *Cancer Res.* 53 (1993) 4701–4714.
- [41] G. Baffy, T. Miyashita, J.R. Williamson, J.C. Reed, Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 6511–6519.
- [42] L. Magnelli, M. Cinelli, A. Turchetti, V.P. Chiarugi, Bcl-2 overexpression abolishes early calcium waving preceding apoptosis in NIH-3T3 murine fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204 (1994) 84–90.
- [43] M. Lam, G. Dubyak, L. Chen, G. Nuñez, R.L. Miesfeld, C.W. Distelhorst, Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 6569–6573.
- [44] C.W. Distelhorst, M. Lam, T.S. McCormick, Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca²⁺ pool depletion, *Oncogene* 12 (1996) 2051–2055.
- [45] M. Ichimiya, S.H. Chang, H. Liu, I.K. Berezsky, B.F. Trump, P.A. Amstad, Effect of Bcl-2 on oxidant-induced cell death and intracellular Ca²⁺ mobilization, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) C832–C839.
- [46] H. He, M. Lam, T.S. McCormick, C.W. Distelhorst, Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2, *J. Cell Biol.* 138 (1997) 1219–1228.
- [47] S.L. Schendel, Z. Xie, M.O. Montal, S. Matsuyama, M. Montal, J.C. Reed, Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 5113–5118.
- [48] A.J. Minn, P. Vélez, S.L. Schendel, H. Liang, S.W. Muchmore, S.W. Fesik, M. Fill, C.B. Thompson, Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes, *Nature* 385 (1997) 353–357.
- [49] T.H. Kuo, H.R. Kim, L. Zhu, Y. Yu, H.M. Lin, W. Tsang, Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2, *Oncogene* 17 (1998) 1903–1910.
- [50] L. Zhu, S. Ling, X.D. Yu, L.K. Venkatesh, T. Subramanian, G. Chinnadurai, T.H. Kuo, Modulation of mitochondrial Ca²⁺ homeostasis by Bcl-2, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 33267–33273.
- [51] E.M. Koberinsky, M.A. Kirchberger, Evidence for a role of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in thapsigargin and Bcl-2 induced changes in *Xenopus laevis* oocyte maturation, *Oncogene* 20 (2001) 933–941.
- [52] P. Pinton, D. Ferrari, P. Magalhães, K. Schulze-Osthoff, F. Di Virgilio, T. Pozzan, R. Rizzuto, Reduced loading of intracellular Ca²⁺ stores and downregulation of capacitative Ca²⁺ influx in Bcl-2-overexpressing cells, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 857–862.
- [53] R. Foyouzi-Youssefi, S. Armaudeau, C. Borner, W.L. Kelley, J. Tschoop, D.P. Lew, N. Demareux, K.H. Krause, Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 5723–5728.
- [54] F. Vanden Abeele, R. Skryma, Y. Shuba, F. Van Coppenolle, C. Slomianny, M. Roudbaraki, B. Mauroy, F. Wuytack, N. Prevorskaya, Bcl-2-dependent modulation of Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells, *Cancer Cell* 1 (2002) 169–179.
- [55] A.E. Palmer, C. Jin, J.C. Reed, R.Y. Tsien, Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 17404–17409.
- [56] M. Chami, A. Prandini, M. Campanella, P. Pinton, G. Szabadkai, J.C. Reed, R. Rizzuto, Bcl-2 and Bax exert opposing effects on Ca²⁺ signaling, which do not

- depend on their putative pore-forming region, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 54581–54589.
- [57] E.S. Dremine, V.S. Sharov, K. Kumar, A. Zaidi, E.K. Michaelis, C. Schöneich, Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA), *Biochem. J.* 383 (2004) 361–370.
 - [58] M.C. Bassik, L. Scorrano, S.A. Oakes, T. Pozzan, S.J. Korsmeyer, Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis, *EMBO J.* 23 (2004) 1207–1216.
 - [59] C. Xu, W. Xu, A.E. Palmer, J.C. Reed, Bcl-1 regulates endoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis downstream of Bcl-2 family proteins, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 11477–11484.
 - [60] H.-R. Kim, G.-H. Lee, K.-C. Ha, T. Ahn, J.-Y. Moon, B.-J. Lee, S.-G. Cho, S. Kim, Y.-R. Seo, Y.-J. Shin, S.-W. Chae, J.C. Reed, H.-J. Chae, Bax inhibitor-1 is a pH-dependent regulator of Ca²⁺ channel activity in the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 15946–15955.
 - [61] G. Bultynck, S. Kiviluoto, N. Henke, H. Ivanova, L. Schneider, V. Rybalchenko, T. Luyten, K. Nuyts, W. De Borggraef, I. Bezprozvanny, J.B. Parys, H. De Smedt, L. Missiaen, A. Methner, The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca²⁺-permeable channel pore, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 2544–2557.
 - [62] S. Kiviluoto, L. Schneider, T. Luyten, T. Vervliet, L. Missiaen, H. De Smedt, J.B. Parys, A. Methner, G. Bultynck, Bax inhibitor-1 is a novel IP₃ receptor-interacting and -sensitizing protein, *Cell Death Dis.* 3 (2012) e367.
 - [63] R. Chen, I. Valencia, F. Zhong, K.S. McCol, H.L. Roderick, M.D. Bootman, M.J. Berridge, S.J. Conway, A.B. Holmes, G.A. Mignery, P. Velez, C.W. Distelhorst, Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate, *J. Cell Biol.* 166 (2004) 193–203.
 - [64] C.J. Hanson, M.D. Bootman, C.W. Distelhorst, R.J.H. Wojcikiewicz, H.L. Roderick, Bcl-2 suppresses Ca²⁺ release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and inhibits Ca²⁺ uptake by mitochondria without affecting ER calcium store content, *Cell Calcium* 44 (2008) 324–338.
 - [65] Y.-P. Rong, A.S. Aromolaran, G. Bultynck, F. Zhong, X. Li, K. McCol, S. Matsuyama, S. Herlitz, H.L. Roderick, M.D. Bootman, G.A. Mignery, J.B. Parys, H. De Smedt, C.W. Distelhorst, Targeting Bcl-2-IP₃ receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals, *Mol. Cell* 31 (2008) 255–265.
 - [66] Y.-P. Rong, G. Bultynck, A.S. Aromolaran, F. Zhong, J.B. Parys, H. De Smedt, G.A. Mignery, H.L. Roderick, M.D. Bootman, C.W. Distelhorst, The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP₃ receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 14397–14402.
 - [67] G. Monaco, E. Decrock, H. Akl, R. Ponsaerts, T. Vervliet, T. Luyten, M. De Maeyer, L. Missiaen, C.W. Distelhorst, H. De Smedt, J.B. Parys, L. Leybaert, G. Bultynck, Selective regulation of IP₃-receptor-mediated Ca²⁺ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-XL, *Cell Death Differ.* (2011) 1–15.
 - [68] C. White, C. Li, J. Yang, N.B. Petrenko, M. Madesh, C.B. Thompson, J.K. Foskett, The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP₃R, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 1021–1028.
 - [69] C. Li, X. Wang, H. Vais, C.B. Thompson, J.K. Foskett, C. White, Apoptosis regulation by Bcl-x(L) modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 12565–12570.
 - [70] G. Monaco, T. Vervliet, H. Akl, G. Bultynck, The selective BH4-domain biology of Bcl-2-family members: IP₃Rs and beyond, *Cell Mol. Life Sci.* (2012).
 - [71] E.F. Eckenrode, J. Yang, Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Ca²⁺ signaling, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 13678–13684.
 - [72] G. Monaco, M. Beckers, H. Ivanova, L. Missiaen, J.B. Parys, H. De Smedt, G. Bultynck, Profiling of the Bcl-2/Bcl-X(L)-binding sites on type 1 IP₃ receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428 (2012) 31–35.
 - [73] Z. Pan, M.B. Bhat, A.L. Nieminen, J. Ma, Synergistic movements of Ca²⁺ and Bax in cells undergoing apoptosis, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32257–32263.
 - [74] L.K. Nutt, A. Pataer, J. Pahler, B. Fang, J. Roth, D.J. McConkey, S.G. Swisher, Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 9219–9225.
 - [75] L.K. Nutt, J. Chandra, A. Pataer, B. Fang, J.A. Roth, S.G. Swisher, R.G. O'Neill, D.J. McConkey, Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 20301–20308.
 - [76] W.-X. Zong, C. Li, G. Hatzivassiliou, T. Lindsten, Q.-C. Yu, J. Yuan, C.B. Thompson, Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis, *J. Cell Biol.* 162 (2003) 59–69.
 - [77] M. Klee, K. Pallau, S. Alcalá, A. Fleischer, F.X. Pimentel-Muñoz, Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak, *EMBO J.* 28 (2009) 1757–1768.
 - [78] L. Scorrano, S.A. Oakes, J.T. Opferman, E.H. Cheng, M.D. Sorcinelli, T. Pozzan, S.J. Korsmeyer, BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis, *Science* 300 (2003) 135–139.
 - [79] S.A. Oakes, L. Scorrano, J.T. Opferman, M.C. Bassik, M. Nishino, T. Pozzan, S.J. Korsmeyer, Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 105–110.
 - [80] M. Germain, J.P. Mathai, G.C. Shore, BH3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18053–18060.
 - [81] J.P. Mathai, M. Germain, G.C. Shore, BH3-only BIK regulates BAX, BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 23829–23836.
 - [82] T.E. Gunter, L. Buntinas, G. Sparagna, R. Eliseev, K. Gunter, Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions, *Cell Calcium* 28 (2000) 285–296.
 - [83] A.N. Murphy, D.E. Bredesen, G. Cortopassi, E. Wang, G. Fiskum, Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 9893–9898.
 - [84] H. Hirata, G.S. Lopes, A. Jurkiewicz, L. Garcez-do-Carmo, S.S. Smaili, Bcl-2 modulates endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium stores in PC12 cells, *Neurochem. Res.* 37 (2012) 238–243.
 - [85] L. Zhu, Y. Yu, B.H. Chua, Y.S. Ho, T.H. Kuo, Regulation of sodium–calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33 (2001) 2135–2144.
 - [86] V. Gogvadze, J.D. Robertson, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 19066–19071.
 - [87] A.C.P. Carvalho, J. Sharpe, T.R. Rosenstock, Bax affects intracellular Ca²⁺ stores and induces Ca²⁺ wave propagation, *Cell Death Differ.* 11 (2004) 1265–1276.
 - [88] P.H. Schlesinger, A. Gross, X.M. Yin, K. Yamamoto, M. Saito, G. Waksman, S.J. Korsmeyer, Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 11357–11362.
 - [89] R. Rizzuto, S. Marchi, M. Bonora, P. Aguiari, A. Bononi, D. De Stefani, C. Giorgi, S. Leo, A. Rimesi, R. Siviero, E. Zecchini, P. Pinton, Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 1342–1351.
 - [90] V. Shoshan-Barmatz, D. Gincel, The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death, *Cell Biochem. Biophys.* 39 (2003) 279–292.
 - [91] W. Tan, M. Colombini, VDAC closure increases calcium ion flux, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 2510–2515.
 - [92] S. Shimizu, M. Narita, Y. Tsujimoto, Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC, *Nature* 399 (1999) 483–487.
 - [93] S. Shimizu, A. Konishi, T. Kodama, Y. Tsujimoto, BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 3100–3105.
 - [94] T. Sugiyama, S. Shimizu, Y. Matsuoka, Y. Yoneda, Y. Tsujimoto, Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim, *Oncogene* 21 (2002) 4944–4956.
 - [95] N. Arbel, D. Ben-Hail, V. Shoshan-Barmatz, Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 23152–23161.
 - [96] A. Tikunov, C.B. Johnson, P. Padiadakis, N. Markevich, J.M. Macdonald, J.J. Lemasters, E. Holmuhamedov, Closure of VDAC causes oxidative stress and accelerates the Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition in rat liver mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.* 495 (2010) 174–181.
 - [97] M.G. Vander Heiden, X.X. Li, E. Gottlieb, R.B. Hill, C.B. Thompson, M. Colombini, Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 19414–19419.
 - [98] T.K. Rostovtseva, B. Antonsson, M. Suzuki, R.J. Youle, M. Colombini, S.M. Bezrukov, Bid, but not Bax, regulates VDAC channels, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13575–13583.
 - [99] C.O. Eno, E.F. Eckenrode, K.E. Olberding, G. Zhao, C. White, C. Li, Distinct roles of mitochondria- and ER-localized Bcl-xL in apoptosis resistance and Ca²⁺ homeostasis, *Mol. Biol. Cell* 23 (2012) 2605–2618.
 - [100] S.S. Roy, M. Madesh, E. Davies, B. Antonsson, N. Danial, G. Hajnóczky, Bad targets the permeability transition pore independent of Bax or Bak to switch between Ca²⁺-dependent cell survival and death, *Mol. Cell* 33 (2009) 377–388.
 - [101] K.S. McCommis, C.P. Baines, The role of VDAC in cell death: friend or foe? *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 1444–1450.
 - [102] G.P. Linette, Y. Li, K. Roth, S.J. Korsmeyer, Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 9545–9552.
 - [103] L.A.O. Reilly, D.C.S. Huang, A. Strasser, The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry, *EMBO J.* 15 (1996) 6979–6990.
 - [104] C. Greider, A. Chattopadhyay, C. Parkhurst, E. Yang, BCL-x(L) and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases, *Oncogene* 21 (2002) 7765–7775.
 - [105] Y.M. Janumyan, C.G. Sansam, A. Chattopadhyay, N. Cheng, E.L. Soucie, L.Z. Penn, D. Andrews, C.M. Knudson, E. Yang, Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry, *EMBO J.* 22 (2003) 5459–5470.
 - [106] H.J. Brady, G. Gil-Gómez, J. Kirberg, A.J. Berns, Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells, *EMBO J.* 15 (1996) 6991–7001.
 - [107] D.C. Huang, L.A. O'Reilly, A. Strasser, S. Cory, The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry, *EMBO J.* 16 (1997) 4628–4638.
 - [108] Y.J. Chen, J.K. Lin, S.Y. Lin-Shiau, Proliferation arrest and induction of CDK inhibitors p21 and p27 by depleting the calcium store in cultured C6 glioma cells, *Eur. J. Cell Biol.* 78 (1999) 824–831.
 - [109] Y. Janumyan, Q. Cui, L. Yan, C.G. Sansam, M. Valentin, E. Yang, G0 function of BCL2 and BCL-xL requires BAX, BAK, and p27 phosphorylation by Mirk, revealing a novel role of BAX and BAK in quiescence regulation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 34108–34120.
 - [110] C.R. Kahl, A.R. Means, Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways, *Endocr. Rev.* 24 (2003) 719–736.
 - [111] K.A. Skelding, J.A.P. Rostas, N.M. Verrills, Controlling the cell cycle: the role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II, *Cell Cycle* 10 (2011) 631–639.

- [112] N. Li, C. Wang, Y. Wu, X. Liu, X. Cao, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II promotes cell cycle progression by directly activating MEK1 and subsequently modulating p27 phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 3021–3027.
- [113] Y.H. Ling, C. Tornos, R. Perez-Soler, Phosphorylation of Bcl-2 is a marker of M phase events and not a determinant of apoptosis, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18984–18991.
- [114] C.D. Scatena, Z.A. Stewart, D. Mays, L.J. Tang, C.J. Keefer, S.D. Leach, J.A. Pietenpol, Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 30777–30784.
- [115] K. Yamamoto, H. Ichijo, S.J. Korsmeyer, BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G2/M, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 8469–8478.
- [116] D.E. Merry, D.J. Veis, W.F. Hickey, S.J. Korsmeyer, bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS, *Development* 120 (1994) 301–311.
- [117] M. González-García, I. García, L. Ding, S. O'Shea, L.H. Boise, C.B. Thompson, G. Núñez, Bcl-X is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 4304–4308.
- [118] N. Motoyama, F. Wang, K.A. Roth, H. Sawa, K. Nakayama, I. Negishi, S. Senju, Q. Zhang, S. Fujii, Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice, *Science* 267 (1995) 1506–1510.
- [119] T.M. Michaelidis, M. Sendtner, J.D. Cooper, M.S. Airaksinen, B. Holtmann, M. Meyer, H. Thoenen, Inactivation of bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development, *Neuron* 17 (1996) 75–89.
- [120] K.-S. Cho, L. Yang, B. Lu, H. Feng Ma, X. Huang, M. Pekny, D.F. Chen, Re-establishing the regenerative potential of central nervous system axons in postnatal mice, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 863–872.
- [121] Y.J. Oh, B.C. Swarzenski, K.L. O'Malley, Overexpression of Bcl-2 in a murine dopaminergic neuronal cell line leads to neurite outgrowth, *Neurosci. Lett.* 202 (1996) 161–164.
- [122] M. Hilton, G. Middleton, A.M. Davies, Bcl-2 influences axonal growth rate in embryonic sensory neurons, *Curr. Biol.* 7 (1997) 798–800.
- [123] D. Chen, G. Schneider, J. Martinou, S. Tonegawa, Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS, *Nature* 385 (1997) 434–439.
- [124] J. Jiao, X. Huang, R.A. Feit-Leithman, R.L. Neve, W. Snider, D.A. Darrt, D.F. Chen, Bcl-2 enhances Ca^{2+} signaling to support the intrinsic regenerative capacity of CNS axons, *EMBO J.* 24 (2005) 1068–1078.
- [125] R. Waltereit, M. Weller, Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity, *Mol. Neurobiol.* 27 (2003) 99–106.
- [126] A. Gal, K. Pentelényi, V. Remenyi, E.A. Wappler, G. Safrany, J. Skopal, Z. Nagy, Bcl-2 or bcl-XL gene therapy increases neural plasticity proteins nestin and c-fos expression in PC12 cells, *Neurochem. Int.* 55 (2009) 349–353.
- [127] J. Henley, M. Poo, Guiding neuronal growth cones using Ca^{2+} signals, *Trends Cell Biol.* 14 (2004) 320–330.
- [128] M.R. Hansen, P.C. Roehm, N. Xu, S.H. Green, Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL prevents spiral ganglion neuron death and inhibits neurite growth, *Dev. Neurobiol.* 3 (2006) 316–325.
- [129] J.P. Renton, N. Xu, J.J. Clark, M.R. Hansen, Interaction of neurotrophin signaling with Bcl-2 localized to the mitochondria and endoplasmic reticulum on spiral ganglion neuron survival and neurite growth, *J. Neurosci. Res.* 88 (2010) 2239–2251.
- [130] L. Rondi-Reig, Y. Lemaigre Dubreuil, J.C. Martinou, N. Delhaye-Bouchaud, J. Caston, J. Mariani, Fear decrease in transgenic mice overexpressing bcl-2 in neurons, *NeuroReport* 8 (1997) 2429–2432.
- [131] R. Lien, S. Flaisher-Grinberg, C. Cleary, M. Hejny, H. Einat, Behavioral effects of Bcl-2 deficiency: implications for affective disorders, *Pharmacol. Rep.* 60 (2008) 490–498.
- [132] R. Machado-Vieira, N.B. Pivovarova, R.I. Stanika, P. Yuan, Y. Wang, R. Zhou, C.A. Zarate, W.C. Drevets, C.A. Brantner, A. Baum, G. Laje, F.J. McMahon, G. Chen, J. Du, H.K. Manji, S.B. Andrews, The Bcl-2 gene polymorphism rs956572AA increases inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated endoplasmic reticulum calcium release in subjects with bipolar disorder, *Biol. Psychiatry* 69 (2011) 344–352.
- [133] T. Uemura, M. Green, T.W. Corson, T. Perova, P.P. Li, J.J. Warsh, Bcl-2 SNP rs956572 associates with disrupted intracellular calcium homeostasis in bipolar I disorder, *Bipolar Disord.* 13 (2011) 41–51.
- [134] M.M. Winslow, J.R. Neilson, G.R. Crabtree, Calcium signalling in lymphocytes, *Curr. Opin. Immunol.* 15 (2003) 299–307.
- [135] M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman, The versatility and universality of calcium signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000).
- [136] A. Quintana, E.C. Schwarz, C. Schwindling, P. Lipp, L. Kaestner, M. Hoth, Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 40302–40309.
- [137] A. Quintana, M. Hoth, Mitochondrial dynamics and their impact on T cell function, *Cell Calcium* 52 (2012) 57–63.
- [138] J.C. Rathmell, C.B. Thompson, Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease, *Cell* 109 (Suppl.) (2002) S97–S107.
- [139] M.W. Ludwinski, J. Sun, B. Hilliard, S. Gong, F. Xue, R.J. Carmody, J. DeVirgiliis, Y.H. Chen, Critical roles of Bim in T cell activation and T cell-mediated autoimmune inflammation in mice, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1706–1713.
- [140] F. Zhong, M.C. Davis, K.S. McCol, C.W. Distelhorst, Bcl-2 differentially regulates Ca^{2+} signals according to the strength of T cell receptor activation, *J. Cell Biol.* 172 (2006) 127–137.
- [141] R.G. Jones, T. Bui, C. White, M. Madesh, C.M. Krawczyk, T. Lindsten, B.J. Hawkins, S. Kubek, K.A. Frauwirth, Y.L. Wang, S.J. Conway, H.L. Roderick, M.D. Bootman, H. Shen, J.K. Foskett, C.B. Thompson, The proapoptotic factors Bax and Bak regulate T cell proliferation through control of endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis, *Immunity* 27 (2007) 268–280.
- [142] P.E. Ferdek, A novel role for bcl-2 in regulation of cellular calcium extrusion, *Curr. Biol.* 22 (2012) 1241–1246.
- [143] D. Del Bufalo, A. Biroccio, C. Leonetti, G. Zupi, Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line, *FASEB J.* 11 (1997) 947–953.
- [144] W. Wick, S. Wagner, S. Kerkau, J. Dichgans, T.C. Jörg, M. Weller, BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells, *FEBS Lett.* 440 (1998) 419–424.
- [145] B. Bauvois, New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression, *Biochim. Biophys. Acta* 1825 (2012) 29–36.
- [146] J. Choi, K. Choi, E.N. Benveniste, S.B. Rho, Y.-S. Hong, J.-H. Lee, J. Kim, K. Park, Bcl-2 promotes invasion and lung metastasis by inducing matrix metalloproteinase-2, *Cancer Res.* 65 (2005) 5554–5560.
- [147] A. Schaefer, M. Magócsi, A. Fandrich, H. Marquardt, Stimulation of the Ca^{2+} -mediated egr-1 and c-fos expression in murine erythroleukemia cells by cyclosporin A, *Biochem. J.* 335 (Pt 3) (1998) 505–511.
- [148] X. Wang, K. Belguisse, N. Kersual, K.H. Kirsch, N.D. Mineva, F. Galtier, D. Chablos, G.E. Sonenshein, Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 470–478.
- [149] Z. Wang, W. Song, A. Aboukameel, M. Mohammad, G. Wang, S. Banerjee, D. Kong, S. Wang, F.H. Sarkar, R.M. Mohammad, TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, inhibits cell growth and invasion in pancreatic cancer, *Int. J. Cancer* 123 (2008) 958–966.
- [150] H.L. Pahl, P.A. Baeuerle, Activation of NF- κ B by ER stress requires both Ca^{2+} and reactive oxygen intermediates as messengers, *FEBS Lett.* 392 (1996) 129–136.
- [151] C. Wei, X. Wang, M. Zheng, H. Cheng, Calcium gradients underlying cell migration, *Curr. Opin. Cell Biol.* 24 (2012) 254–261.
- [152] J. Rinkenberger, S. Horning, Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality, *Genes Dev.* 14 (2000) 23–27.
- [153] J.J. Stachecki, D.R. Armant, Transient release of calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-specific stores regulates mouse preimplantation development, *Development* 122 (1996) 2485–2496.
- [154] J. Wang, L. Mayermik, D.R. Armant, Integrin signaling regulates blastocyst adhesion to fibronectin at implantation: intracellular calcium transients and vesicle trafficking in primary trophoblast cells, *Dev. Biol.* 245 (2002) 270–279.
- [155] G. Gillet, M. Guerin, A. Trembleau, G. Brun, A Bcl-2-related gene is activated in avian cells transformed by the Rous sarcoma virus, *EMBO J.* 14 (1995) 1372–1381.
- [156] A.L. Johnson, J.T. Bridgman, J.P. Witty, J.L. Tilly, Expression of bcl-2 and nr-13 in hen ovarian follicles during development, *Biol. Reprod.* 57 (1997) 1096–1103.
- [157] R.M. Lee, G. Gillet, J. Burnside, S.J. Thomas, P. Neiman, Role of Nr13 in regulation of programmed cell death in the bursa of Fabricius, *Genes Dev.* 13 (1999) 718–728.
- [158] A. Aouacheria, E. Arnaud, S. Venet, P. Lalle, M. Gouy, D. Rigal, G. Gillet, Nr13, a human homologue of Nr-13 associates with Bcl-Xs and is an inhibitor of apoptosis, *Oncogene* 20 (2001) 5846–5855.
- [159] Y. Guillemain, P. Lalle, G. Gillet, J.F. Guerin, S. Hamamah, A. Aouacheria, Oocytes and early embryos selectively express the survival factor BCL2L10, *J. Mol. Med.* 87 (2009) 923–940.
- [160] N. Inohara, T.S. Gourley, R. Carrio, M. Muñoz, J. Merino, I. Garcia, T. Koseki, Y. Hu, S. Chen, G. Núñez, Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32479–32486.
- [161] S.-J. Yoon, E.-Y. Kim, Y.S. Kim, H.-S. Lee, K.-H. Kim, J. Bae, K.-A. Lee, Role of Bcl2-like 10 (Bcl2l10) in regulating mouse oocyte maturation, *Biol. Reprod.* 81 (2009) 497–506.
- [162] M.K. Jaglarz, F. Bazile, K. Laskowska, Z. Polanski, F. Chesnel, E. Borsuk, M. Kloc, J.Z. Kubiak, Association of TCTP with centrosome and microtubules, *Biochem. Res. Int.* 2012 (2012) 541906.
- [163] E. Arnaud, K.F. Ferri, J. Thibaut, Z. Haftek-Terrau, A. Aouacheria, D. Le Guellec, T. Lorca, G. Gillet, The zebrafish bcl-2 homologue Nr2 controls development during somitogenesis and gastrulation via apoptosis-dependent and -independent mechanisms, *Cell Death Differ.* 13 (2006) 1128–1137.
- [164] N. Popgeorgiev, J. Prudent, B. Bonneau, G. Gillet, The yolk cell of the zebrafish blastula harbors functional apoptosis machinery, *Commun. Integr. Biol.* (2011) 549–551.
- [165] N. Popgeorgiev, B. Bonneau, K.F. Ferri, J. Prudent, J. Thibaut, G. Gillet, The apoptotic regulator Nr2 controls cytoskeletal dynamics via the regulation of Ca^{2+} trafficking in the zebrafish blastula, *Dev. Cell* 20 (2011) 663–676.
- [166] S.E. Webb, A.L. Miller, Calcium signalling during embryonic development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 539–551.
- [167] B. Bonneau, N. Popgeorgiev, J. Prudent, G. Gillet, Cytoskeleton dynamics in early zebrafish development: a matter of phosphorylation? *BioArchitecture* 1 (2011) 216–220.

Article annexe n°3

The yolk cell of the zebrafish blastula harbors functional apoptosis machinery

Popgeorgiev N, Prudent J, Bonneau B, Gillet G

Commun Integr Biol, 2011 Sep;4(5):549-51.

The yolk cell of the zebrafish blastula harbors functional apoptosis machinery

Nikolay Popgeorgiev,[†] Julien Prudent,[†] Benjamin Bonneau and Germain Gillet*

CRCL U1052 INSERM; UMS 3453 CNRS-Université Lyon 1; Centre Léon Bérard; Lyon, France

[†]These authors contributed equally to this work.

We recently described the implication of the Bcl-2 related anti-apoptotic Nrz protein during early zebrafish development. *Nrz* knock-down induces calcium-dependent cytoskeleton remodeling leading to margin constriction and premature embryo lethality. In the YSL, *nrz* knock-down embryos exhibit some typical features of apoptosis such as mitochondrial transmembrane potential loss and cytochrome *c* release. However, downstream caspase-3 activation has not been detected so far. Here, we report that the YSL contains fully functional apoptotic machinery that can activate caspase-3 following zBax ectopic expression. Furthermore, we present evidence that caspase-3 activation is actually detectable in *nrz* knock-down embryos when premature margin constriction is prevented.

In multicellular organisms, programmed cell death is an essential cellular process contributing to embryonic development and morphogenesis. Initial studies conducted on the zebrafish embryo showed that the cell death machinery can be induced at the onset of zygotic gene expression.^{1,2} During zebrafish development, apoptosis is under the active control of the Bcl-2 family of proteins which primarily regulates the mitochondrial cell death pathway.³ Interestingly, in zebrafish, treatment with chemicals such as nocodazole and camptothecin results in apoptosis in blastomeres located to the enveloping and deep cell layers but not in the yolk syncytial layer (YSL) just beneath.² YSL is an extramembranous tissue formed by the fusion

of margin blastomeres with the yolk cell; it plays critical roles in morphogenesis, nutrients supply and embryo patterning.⁴ Recently, we showed that the knock-down of the *bcl-2* homolog *nrz*, which is specifically expressed in the YSL, results in premature calcium-dependent actin-myosin ring formation due to enhanced phosphorylation of the myosin light chain (MLC1). Constriction of the actin-myosin ring leads to the detachment of the blastomeres from the yolk cell and premature death of the embryo.⁵ Together with this lethal phenotype, mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) loss and cytochrome *c* release were observed in the YSL, whereas no subsequent caspase-3 activation or nuclear fragmentation could be detected, unexpectedly. This raised the idea that upon *nrz* silencing, separation of the blastomeres from the yolk cell may occur before the caspase cascade could be activated. An alternate possibility was that the YSL might be intrinsically unable to activate caspases and execute apoptosis.

To discriminate between these hypotheses, we first evaluated the capacity of purified YSL mitochondria to release cytochrome *c* in vitro. For this purpose, YSL mitochondria were incubated with human recombinant tBid protein (20 nM), a known inducer of Bax-dependent cytochrome *c* release. Indeed, tBid treatment of YSL mitochondria induced partial cytochrome *c* release in the supernatant (Fig. 1A), suggesting that in the YSL, endogenous zBax can be activated and induces outer mitochondrial membrane permeability. To further assess the ability of zBax to trigger

Key words: apoptosis, zebrafish, caspases, cytochrome *c* release, YSL, Nrz, zBax

Submitted: 05/29/11

Accepted: 05/30/11

DOI: 10.4161/cib.4.5.16697

*Correspondence to: Germain Gillet;
Email: gillet@lyon.fnclcc.fr

Addendum to: Popgeorgiev N, Bonneau B, Ferri KF, Prudent J, Thibaut J, Gillet G. The Apoptotic Regulator Nrz Controls Cytoskeletal Dynamics via the Regulation of Ca²⁺ Trafficking in the Zebrafish Blastula. *Dev Cell* 2011; 20:663–76.
PMID: 21571223; DOI: 10.1016/j.devcel.2011.05.011

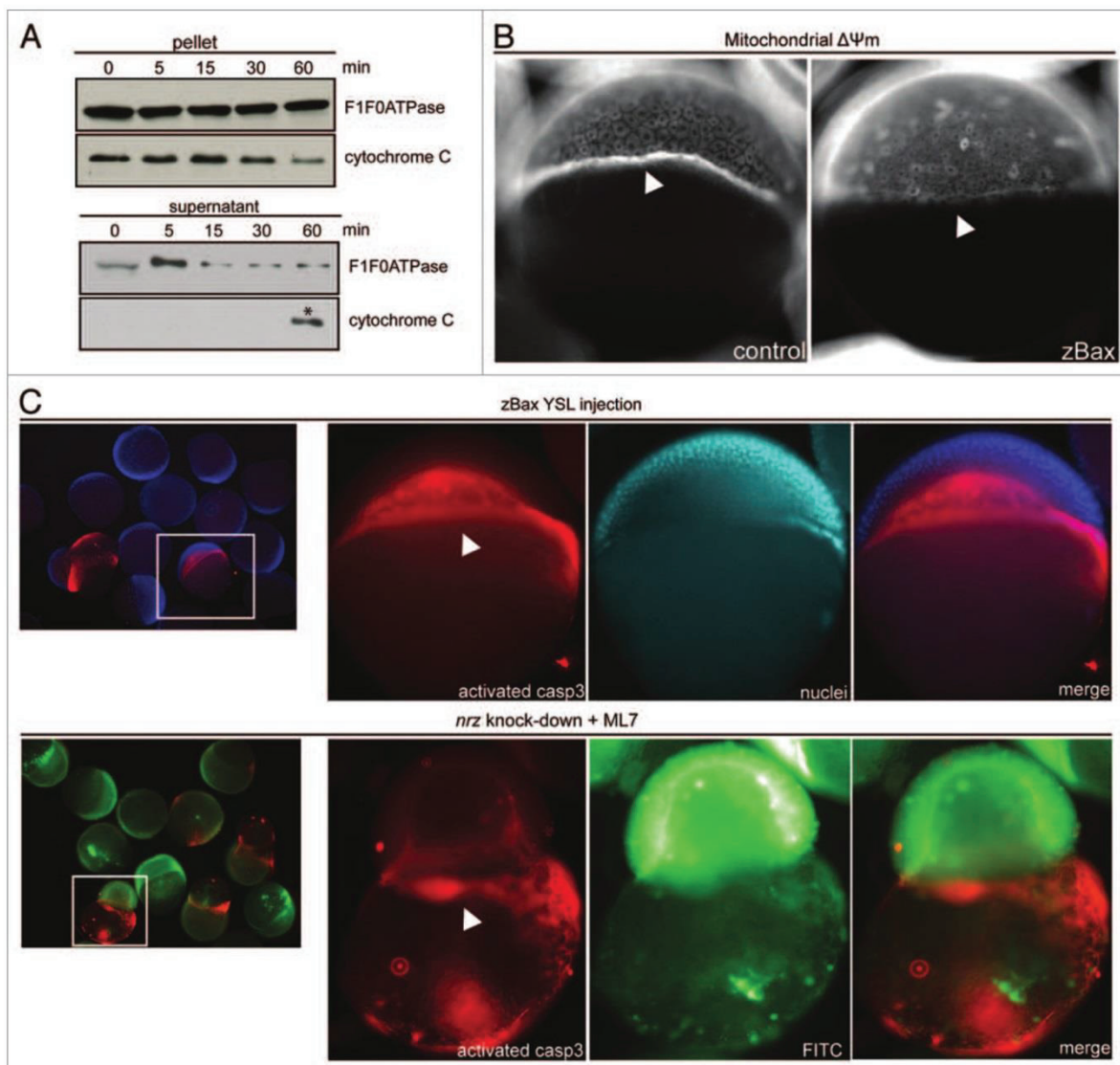


Figure 1. The zebrafish YSL contains inducible apoptotic machinery. (A) Western blotting detection of cytochrome C from purified YSL mitochondria treated with tBid (20 nM) for increasing time durations (0–60 min). After treatment, mitochondria were pelleted by centrifugation; at 60 min, released cytochrome C due to outer membrane permeabilization was eventually found in the supernatant. The same western blot was probed with anti-F₀/F₁ ATPase antibody for calibration purpose (top panels). (B) Images of Mitotracker Red-stained embryos injected with control (left panel) or zBax mRNA (right panel). White arrowheads show YSL mitochondria location; zBax-injected embryos exhibit dramatic decrease of the labeling of the YSL mitochondria belt. (C) Immunostaining of activated caspase-3 in zBax-injected embryos (top panels). Embryos were counterstained with nuclear Hoescht33342. *Nrz* knock-down embryos coinjected with dextran-FITC were treated with ML-7 for 3 h prior staining (bottom panels). Active caspase-3 is mainly found in the YSL (white arrowheads).

YSL mitochondria swelling, we injected in vitro synthesized zBax mRNA in the YSL of zebrafish embryos at oblong stage. Interestingly, this resulted in the decrease of $\Delta\Psi_m$ mitochondrial potential in the YSL, compared to control embryos,

without affecting the blastomeres (Fig. 1B). Moreover, this mitochondrial dysfunction appeared to lead to caspase activation. Indeed, immunodetection of active caspase-3 in zebrafish embryos, showed that zBax mRNA injection

specifically triggers caspase-3 activation in the YSL (Fig. 1C). Together, these results showed that in the YSL the apoptotic machinery is actually fully functional.

These observations prompted us to check if, in *nrz* knock-down embryos,

caspase-3 activation could be detected in *nrz*-silenced embryos maintained alive by blocking the premature constriction of the actin-myosin ring. For this purpose, zebrafish embryos (1–4 cells stage) were injected with *nrz* specific antisense morpholino (0.5 mM) and treated with MLCK inhibitor (ML-7; 50 μ M) later on. Surprisingly, in such conditions, activated caspase-3 was specifically detected in the YSL in almost 50% of the embryos (44.5%, n = 22) (Fig. 1C).

Together, these results indicated that during early zebrafish development, the cell death machinery is mainly controlled by the Nrz protein in the YSL. Indeed, our previous observations demonstrated that during gastrulation, *nrz* gene expression is restricted to the YSL, contrary to other anti-apoptotic *bcl-2* related genes.⁶ Furthermore, we showed that YSL

mitochondria contain significant amounts of Nrz protein whereas other cell death inhibitors, such as Bcl-2 itself, remained undetectable (Bonneau B, et al. unpublished). Thus, Nrz appears to play a dual role in the YSL: (1) in the regulation of calcium trafficking and cytoskeleton remodeling and (2) in the preservation of mitochondrial integrity and apoptosis inhibition.

Why the YSL appears to be resistant to a broad range of apoptotic stimuli remains an open question. Indeed, in zebrafish, the YSL is crucial for early embryonic development, uncontrolled activation of the cell death program during gastrulation being embryonic lethal. Thus it may be speculated that such YSL resistance to death-inducing stimuli is ensured by the anti-apoptotic capacities of Nrz. Further studies will be required to validate this assumption.

References

1. Ikegami R, Zhang J, Rivera-Bennetts AK, Yager TD. Activation of the metaphase checkpoint and an apoptosis programme in the early zebrafish embryo, by treatment with the spindle-destabilising agent nocodazole. *Zygote* 1997; 5:329-50.
2. Ikegami R, Hunter P, Yager TD. Developmental activation of the capability to undergo checkpoint-induced apoptosis in the early zebrafish embryo. *Dev Biol* 1999; 209:409-33.
3. Kratz E, Eimon PM, Mukhyala K, Stern H, Zha J, Strasser A, et al. Functional characterization of the Bcl-2 gene family in the zebrafish. *Cell Death Differ* 2006; 13:1631-40.
4. Carvalho L, Heisenberg CP. The yolk syncytial layer in early zebrafish development. *Trends Cell Biol* 2005; 15:86-92.
5. Popgeorgiev N, Bonneau B, Ferri KF, Prudent J, Thibaut J, Giller G. The apoptotic regulator Nrz controls cytoskeletal dynamics via the regulation of Ca(2+) trafficking in the zebrafish blastula. *Dev Cell* 2006; 11:663-76.
6. Arnaud E, Ferri KF, Thibaut J, Haftek-Terreau Z, Auouacheria A, Le Guellec D, et al. The zebrafish bcl-2 homologue Nrz controls development during somitogenesis and gastrulation via apoptosis-dependent and -independent mechanisms. *Cell Death Differ* 2006; 13:1128-37.

BIBLIOGRAPHIE

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., and Akey, C.W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9, 423–432.

Adkins, C.E., Morris, S.A., De Smedt, H., Sienaert, I., Török, K., and Taylor, C.W. (2000). Ca^{2+} -calmodulin inhibits Ca^{2+} release mediated by type-1, -2 and -3 inositol trisphosphate receptors. *Biochem J* 345 Pt 2, 357–363.

Adkins, C.E., and Taylor, C.W. (1999). Lateral inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cytosolic Ca^{2+} . *Curr Biol* 9, 1115–1118.

Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745–756.

Ahumada, A., Slusarski, D.C., Liu, X., Moon, R.T., Malbon, C.C., and Wang, H. (2002). Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP. *Science* 298, 2006–2010.

Akl, H., Monaco, G., La Rovere, R., Welkenhuyzen, K., Kiviluoto, S., Vervliet, T., Molgó, J., Distelhorst, C.W., Missiaen, L., Mikoshiba, K., et al. (2013). IP3R2 levels dictate the apoptotic sensitivity of diffuse large B-cell lymphoma cells to an IP3R-derived peptide targeting the BH4 domain of Bcl-2. *Cell Death Dis* 4, e632.

Alavian, K.N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., Lazrove, E., Nabili, P., Flaherty, B., Graham, M., et al. (2011). Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nat Cell Biol* 13, 1224–1233.

Alzayady, K.J., Chandrasekhar, R., and Yule, D.I. (2013). Fragmented inositol 1,4,5-trisphosphate receptors retain tetrameric architecture and form functional Ca^{2+} release channels. *J Biol Chem* 288, 11122–11134.

Amsterdam, A., and Hopkins, N. (2003). Retroviral-mediated insertional mutagenesis in zebrafish. *Methods In Cell Biology* 77, 3–20.

Ando, H., Mizutani, A., Kiefer, H., Tsuzurugi, D., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2006). IRBIT suppresses IP3 receptor activity by competing with IP3 for the common binding site on the IP3 receptor. *Mol Cell* 22, 795–806.

Ando, H., Mizutani, A., Matsu-ura, T., and Mikoshiba, K. (2003). IRBIT, a novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor-binding protein, is released from the IP3 receptor upon IP3 binding to the receptor. *J Biol Chem* 278, 10602–10612.

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermoud, J.J., Mazzei, G., et al. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370–372.

Anyatonwu, G., Khan, M.T., Schug, Z.T., da Fonseca, P.C. a, Morris, E.P., and Joseph, S.K. (2010). Calcium-dependent conformational changes in inositol trisphosphate receptors. *J Biol Chem* 285, 25085–25093.

Aouacheria, A., Arnaud, E., Venet, S., Lalle, P., Gouy, M., Rigal, D., and Gillet, G. (2001). Nrh, a human homologue of Nr-13 associates with Bcl-Xs and is an inhibitor of apoptosis. *Oncogene* 20, 5846–5855.

Aouacheria, A., Brunet, F., and Gouy, M. (2005). Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evol* 22, 2395–2416.

Aouacheria, A., Laval, V.R. De, Combet, C., and Hardwick, J.M. (2012). Evolution of Bcl-2 homology motifs: homology versus homoplasy. *Trends Cell Biol* 1–9.

Arbel, N., Ben-Hail, D., and Shoshan-Barmatz, V. (2012). Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein. *J Biol Chem* 287, 23152–23161.

Arguin, G., Regimbald-Dumas, Y., Fregeau, M.-O., Caron, A.Z., and Guillemette, G. (2007). Protein kinase C phosphorylates the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 and decreases the mobilization of Ca²⁺ in pancreatoma AR4-2J cells. *J Endocrinol* 192, 659–668.

Arnaud, E., Ferri, K.F., Thibaut, J., Haftek-Terreau, Z., Aouacheria, A., Le Guellec, D., Lorca, T., and Gillet, G. (2006). The zebrafish bcl-2 homologue Nrz controls development during somitogenesis and gastrulation via apoptosis-dependent and -independent mechanisms. *Cell Death Differ* 13, 1128–1137.

Asnaghi, L., Calastretti, A., Bevilacqua, A., D'Agnano, I., Gatti, G., Canti, G., Delia, D., Capaccioli, S., and Nicolin, A. (2004). Bcl-2 phosphorylation and apoptosis activated by damaged microtubules require mTOR and are regulated by Akt. *Oncogene* 23, 5781–5791.

Assefa, Z., Bultynck, G., Szlufcik, K., Nadif Kasri, N., Vermassen, E., Goris, J., Missiaen, L., Callewaert, G., Parys, J.B., and De Smedt, H. (2004). Caspase-3-induced truncation of type 1 inositol trisphosphate receptor accelerates apoptotic cell death and induces inositol trisphosphate-independent calcium release during apoptosis. *J Biol Chem* 279, 43227–43236.

Ayllón, V., Cayla, X., García, A., Fleischer, A., and Rebollo, A. (2002). The anti-apoptotic molecules Bcl-xL and Bcl-w target protein phosphatase 1alpha to Bad. *Eur J Immunol* 32, 1847–1855.

Ayllón, V., Cayla, X., García, A., Roncal, F., Fernández, R., Albar, J.P., Martínez, C., and Rebollo, A. (2001). Bcl-2 targets protein phosphatase 1 alpha to Bad. *J Immunol* 166, 7345–7352.

Ayllón, V., Martínez-A, C., García, A., Cayla, X., and Rebollo, A. (2000). Protein phosphatase 1alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *EMBO J* 19, 2237–2246.

Azad, A., Fox, J., Leverrier, S., and Storey, A. (2012). Blockade of the BAK hydrophobic groove by inhibitory phosphorylation regulates commitment to apoptosis. *PLoS One* 7, e49601.

Babb, S.G., and Marrs, J.A. (2004). E-cadherin regulates cell movements and tissue formation in early zebrafish embryos. *Dev Dyn* 230, 263–277.

Baffy, G., Miyashita, T., Williamson, J.R., and Reed, J.C. (1993). Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem* 268, 6511–6519.

Bai, G.-R., Yang, L.-H., Huang, X.-Y., and Sun, F.-Z. (2006). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 phosphorylation and regulation by extracellular signal-regulated kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1319–1327.

Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., et al. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658–662.

Baines, C.P., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J., and Molkentin, J.D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9, 550–555.

Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., and Korsmeyer, S.J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around Jh on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899–906.

Bandyopadhyay, A., Shin, D.W., and Kim, D.H. (2000). Regulation of ATP-induced calcium release in COS-7 cells by calcineurin. *Biochem J* 348 Pt 1, 173–181.

Barboule, N., Demeter, K., Benmeradi, N., and Larminat, F. (2009). Bcl-2 is an integral component of mitotic chromosomes. *Cell Biol Int* 33, 572–577.

Bare, D.J., Kettlun, C.S., Liang, M., Bers, D.M., and Mignery, G. a (2005). Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 280, 15912–15920.

Barsukova, A., Komarov, A., Hajnóczky, G., Bernardi, P., Bourdette, D., and Forte, M. (2011). Activation of the mitochondrial permeability transition pore modulates Ca²⁺ responses to physiological stimuli in adult neurons. *Eur J Neurosci* 33, 831–842.

Basañez, G., Sharpe, J.C., Galanis, J., Brandt, T.B., Hardwick, J.M., and Zimmerberg, J. (2002). Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* 277, 49360–49365.

Basañez, G., Zhang, J., Chau, B.N., Maksaev, G.I., Frolov, V.A., Brandt, T.A., Burch, J., Hardwick, J.M., and Zimmerberg, J. (2001). Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J Biol Chem* 276, 31083–31091.

- Bassik, M.C., Scorrano, L., Oakes, S.A., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2004). Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J* 23, 1207–1216.
- Basu, A., and Haldar, S. (2003). Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol- or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis. *FEBS Lett* 538, 41–47.
- Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., et al. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 341–345.
- Bauvois, B. (2012). New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1825, 29–36.
- Bedell, V.M., Wang, Y., Campbell, J.M., Poshusta, T.L., Starker, C.G., Krug, R.G., Tan, W., Penheiter, S.G., Ma, A.C., Leung, A.Y.H., et al. (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* 491, 114–118.
- Behrndt, M., Salbreux, G., Campinho, P., Hauschild, R., Oswald, F., Roensch, J., Grill, S.W., and Heisenberg, C.-P. (2012). Forces Driving Epithelial Spreading in Zebrafish Gastrulation. *Science* (80-) 338, 257–260.
- Bello, D., Aslam, T., Bultynck, G., Slawin, A.M.Z., Roderick, H.L., Bootman, M.D., and Conway, S.J. (2007). Synthesis and biological action of novel 4-position-modified derivatives of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Org Chem* 72, 5647–5659.
- Berglund, H., Olerenshaw, D., Sankar, A., Federwisch, M., McDonald, N.Q., and Driscoll, P.C. (2000). The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain. *J Mol Biol* 302, 171–188.
- Berman, S.B., Chen, Y., Qi, B., McCaffery, J.M., Rucker, E.B., Goebbels, S., Nave, K.-A., Arnold, B.A., Jonas, E.A., Pineda, F.J., et al. (2009). Bcl-x L increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. *J Cell Biol* 184, 707–719.
- Bernardi, P. (2013). The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Frontiers in Physiology* 4, 95.
- Berridge, M.J. (1983). Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem J* 212, 849–858.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517–529.
- Betchaku, T., and Trinkaus, J.P. (1978). Contact relations, surface activity, and cortical microfilaments of marginal cells of the enveloping layer and of the yolk syncytial and yolk cytoplasmic layers of fundulus before and during epiboly. *J Exp Zool* 206, 381–426.

Bezprozvanny, I., and Ehrlich, B.E. (1993). ATP modulates the function of inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels at two sites. *Neuron* 10, 1175–1184.

Bezprozvanny, I., and Ehrlich, B.E. (1994). Inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP3)-gated Ca channels from cerebellum: conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium. *J Gen Physiol* 104, 821–856.

Bhanumathy, C., da Fonseca, P.C. a, Morris, E.P., and Joseph, S.K. (2012). Identification of functionally critical residues in the channel domain of inositol trisphosphate receptors. *J Biol Chem* 287, 43674–43684.

Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G., and Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161, 1169–1175.

Billen, L.P., Shamas-Din, A., and Andrews, D.W. (2008). Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* 27 Suppl 1, S93–104.

Blackshaw, S., Sawa, A., Sharp, A.H., Ross, C.A., Snyder, S.H., and Khan, A.A. (2000). Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates cell death. *FASEB J* 14, 1375–1379.

Blagosklonny, M. V, Giannakakou, P., el-Deiry, W.S., Kingston, D.G., Higgs, P.I., Neckers, L., and Fojo, T. (1997). Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res* 57, 130–135.

Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Seino, S., and Bell, G.I. (1993). Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J Biol Chem* 268, 11356–11363.

Blume-Jensen, P., Janknecht, R., and Hunter, T. (1998). The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol* 8, 779–782.

Boehning, D., and Joseph, S.K. (2000a). Direct association of ligand-binding and pore domains in homo- and heterotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *EMBO J* 19, 5450–5459.

Boehning, D., and Joseph, S.K. (2000b). Functional properties of recombinant type I and type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms expressed in COS-7 cells. *J Biol Chem* 275, 21492–21499.

Boehning, D., Mak, D.O., Foskett, J.K., and Joseph, S.K. (2001). Molecular determinants of ion permeation and selectivity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 276, 13509–13512.

Boehning, D., Patterson, R.L., Sedaghat, L., Glebova, N.O., Kurosaki, T., and Snyder, S.H. (2003). Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 1051–1061.

- Boehning, D., van Rossum, D.B., Patterson, R.L., and Snyder, S.H. (2005). A peptide inhibitor of cytochrome c/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding blocks intrinsic and extrinsic cell death pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 1466–1471.
- Boise, L.H., González-García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuñez, G., and Thompson, C.B. (1993). *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* *74*, 597–608.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., and Greenberg, M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* *286*, 1358–1362.
- Bosanac, I., Alattia, J.-R., Mal, T.K., Chan, J., Talarico, S., Tong, F.K., Tong, K.I., Yoshikawa, F., Furuichi, T., Iwai, M., et al. (2002). Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand. *Nature* *420*, 3–7.
- Bosanac, I., Michikawa, T., Mikoshiba, K., and Ikura, M. (2004). Structural insights into the regulatory mechanism of IP3 receptor. *Biochim Biophys Acta* *1742*, 89–102.
- Bosanac, I., Yamazaki, H., Matsu-Ura, T., Michikawa, T., Mikoshiba, K., and Ikura, M. (2005). Crystal structure of the ligand binding suppressor domain of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Mol Cell* *17*, 193–203.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D.C., Tarlinton, D.M., Kay, T.W., Köntgen, F., Adams, J.M., and Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* *286*, 1735–1738.
- Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.-C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M., and Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* *415*, 922–926.
- Boyd, J.M., Gallo, G.J., Elangovan, B., Houghton, A.B., Malstrom, S., Avery, B.J., Ebb, R.G., Subramanian, T., Chittenden, T., and Lutz, R.J. (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* *11*, 1921–1928.
- Brady, H.J., Gil-Gómez, G., Kirberg, J., and Berns, A.J. (1996). Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J* *15*, 6991–7001.
- Brennan, C., Amacher, S.L., and Currie, P.D. (2002). Somatogenesis. *Results Probl Cell Differ* *40*, 271–297.
- Brill, A., Torchinsky, A., Carp, H., and Toder, V. (1999). The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J Assist Reprod Genet* *16*, 512–519.
- Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z.-J., and Dong, Z. (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 11649–11654.

- Bruce, J.I.E., Shuttleworth, T.J., Giovannucci, D.R., and Yule, D.I. (2002). Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in parotid acinar cells. A mechanism for the synergistic effects of cAMP on Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem* 277, 1340–1348.
- Brustugun, O.T., Fladmark, K.E., Doskeland, S.O., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (1998). Apoptosis induced by microinjection of cytochrome c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2. *Cell Death Differ* 5, 660–668.
- Bultynck, G., Szlufcik, K., Kasri, N.N., Assefa, Z., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J.B., and De Smedt, H. (2004). Thimerosal stimulates Ca²⁺ flux through inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1, but not type 3, via modulation of an isoform-specific Ca²⁺-dependent intramolecular interaction. *Biochem J* 381, 87–96.
- Cade, L., Reyon, D., Hwang, W.Y., Tsai, S.Q., Patel, S., Khayter, C., Joung, J.K., Sander, J.D., Peterson, R.T., and Yeh, J.-R.J. (2012). Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acids Res* 40, 8001–8010.
- Cameron, A.M., Steiner, J.P., Roskams, A.J., Ali, S.M., Ronnett, G. V, and Snyder, S.H. (1995). Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺ flux. *Cell* 83, 463–472.
- Cardy, T.J., and Taylor, C.W. (1998). A novel role for calmodulin: Ca²⁺-independent inhibition of type-1 inositol trisphosphate receptors. *Biochem J* 334 (Pt 2), 447–455.
- Caron, A.Z., Chaloux, B., Arguin, G., and Guillemette, G. (2007). Protein kinase C decreases the apparent affinity of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 in RINm5F cells. *Cell Calcium* 42, 323–331.
- Carreira-Barbosa, F., Concha, M.L., Takeuchi, M., Ueno, N., Wilson, S.W., and Tada, M. (2003). Prickle 1 regulates cell movements during gastrulation and neuronal migration in zebrafish. *Development* 130, 4037–4046.
- Carvalho, A.C.P., Sharpe, J., Rosenstock, T.R., Teles, A.F. V, Youle, R.J., and Smaili, S.S. (2004). Bax affects intracellular Ca²⁺ stores and induces Ca²⁺ wave propagation. *Cell Death Differ* 11, 1265–1276.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351–365.
- Chaloux, B., Caron, A.Z., and Guillemette, G. (2007). Protein kinase A increases the binding affinity and the Ca²⁺ release activity of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 in RINm5F cells. *Biology of the Cell* 99, 379–388.
- Chami, M., Prandini, A., Campanella, M., Pinton, P., Szabadkai, G., Reed, J.C., and Rizzuto, R. (2004). Bcl-2 and Bax exert opposing effects on Ca²⁺ signaling, which do not depend on their putative pore-forming region. *J Biol Chem* 279, 54581–54589.
- Chan, J., Whitten, A.E., Jeffries, C.M., Bosanac, I., Mal, T.K., Ito, J., Porumb, H., Michikawa, T., Mikoshiba, K., Trewella, J., et al. (2007). Ligand-induced conformational

changes via flexible linkers in the amino-terminal region of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Mol Biol* 373, 1269–1280.

Chan, J., Yamazaki, H., Ishiyama, N., Seo, M.-D., Mal, T.K., Michikawa, T., Mikoshiba, K., and Ikura, M. (2010). Structural studies of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: coupling ligand binding to channel gating. *J Biol Chem* 285, 36092–36099.

Chang, D.C., and Lu, P. (2000). Multiple types of calcium signals are associated with cell division in zebrafish embryo. *Microsc Res Tech* 49, 111–122.

Chang, D.C., and Meng, C. (1995). A localized elevation of cytosolic free calcium is associated with cytokinesis in the zebrafish embryo. *J Cell Biol* 131, 1539–1545.

Chang, N., Sun, C., Gao, L., Zhu, D., Xu, X., Zhu, X., Xiong, J.-W., and Xi, J.J. (2013). Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res* 23, 465–472.

Chen, D., Schneider, G., Martinou, J., and Tonegawa, S. (1997). Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature* 385, 434–439.

Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17, 393–403.

Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J.C., and Gottlieb, R.A. (2001). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 276, 30724–30728.

Chen, R., Valencia, I., Zhong, F., McColl, K.S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Conway, S.J., Holmes, A.B., Mignery, G.A., et al. (2004). Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol* 166, 193–203.

Chen, Y.-B., Aon, M.A., Hsu, Y.-T., Soane, L., Teng, X., McCaffery, J.M., Cheng, W.-C., Qi, B., Li, H., Alavian, K.N., et al. (2011). Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential. *J Cell Biol* 195, 263–276.

Chen, Y.J., Lin, J.K., and Lin-Shiau, S.Y. (1999). Proliferation arrest and induction of CDK inhibitors p21 and p27 by depleting the calcium store in cultured C6 glioma cells. *Eur J Cell Biol* 78, 824–831.

Chen, Z.X., and Pervaiz, S. (2007). Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cells. *Cell Death Differ* 14, 1617–1627.

Chen, Z.X., and Pervaiz, S. (2010). Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. *Cell Death Differ* 17, 408–420.

- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966–1968.
- Cheng, E.H.Y., Sheiko, T. V, Fisher, J.K., Craigen, W.J., and Korsmeyer, S.J. (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 301, 513–517.
- Cheng, J.C., Miller, A.L., and Webb, S.E. (2004). Organization and function of microfilaments during late epiboly in zebrafish embryos. *Dev Dyn* 231, 313–323.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18, 157–164.
- Cho, K.-S., Yang, L., Lu, B., Feng Ma, H., Huang, X., Pekny, M., and Chen, D.F. (2005). Re-establishing the regenerative potential of central nervous system axons in postnatal mice. *J Cell Sci* 118, 863–872.
- Choe, C.-U., Harrison, K.D., Grant, W., and Ehrlich, B.E. (2004). Functional coupling of chromogranin with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor shapes calcium signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 35551–35556.
- Choi, J., Choi, K., Benveniste, E.N., Rho, S.B., Hong, Y.-S., Lee, J.-H., Kim, J., and Park, K. (2005). Bcl-2 promotes invasion and lung metastasis by inducing matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res* 65, 5554–5560.
- Choi, S.S., Park, I.C., Yun, J.W., Sung, Y.C., Hong, S.I., and Shin, H.S. (1995). A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene* 11, 1693–1698.
- Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J., and Wagner, G. (1999). Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 96, 615–624.
- Cleary, M.L., Smith, S.D., and Sklar, J. (1986). Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47, 19–28.
- Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A., et al. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 554–559.
- Cole, L.K., and Ross, L.S. (2001). Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Dev Biol* 240, 123–142.
- Combettes, L., Cheek, T.R., and Taylor, C.W. (1996). Regulation of inositol trisphosphate receptors by luminal Ca²⁺ contributes to quantal Ca²⁺ mobilization. *EMBO J* 15, 2086–2093.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.

Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647–656.

Coyle, R.C., Latimer, A., and Jessen, J.R. (2008). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates cell migration during zebrafish gastrulation: evidence for an interaction with non-canonical Wnt signaling. *Experimental Cell Research* 314, 2150–2162.

Crepel, F., Dupont, J.L., and Gardette, R. (1984). Selective absence of calcium spikes in Purkinje cells of staggerer mutant mice in cerebellar slices maintained in vitro. *J Physiol* 346, 111–125.

Créton, R., Speksnijder, J.E., and Jaffe, L.F. (1998). Patterns of free calcium in zebrafish embryos. *J Cell Sci* 111, 1613–1622.

Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T.G., Balla, T., and Hajnóczky, G. (2010). Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol Cell* 39, 121–132.

Cui, J., Matkovich, S.J., deSouza, N., Li, S., Rosemblyt, N., and Marks, A.R. (2004). Regulation of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by phosphorylation at tyrosine 353. *J. Biol. Chem.* 279, 16311–16316.

Curtin, J.F., and Cotter, T.G. (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 15, 983–992.

Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., et al. (2013). Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 152, 519–531.

Da Fonseca, P.C. a, Morris, S. a, Nerou, E.P., Taylor, C.W., and Morris, E.P. (2003). Domain organization of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor as revealed by single-particle analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3936–3941.

Danial, N.N., Gramm, C.F., Scorrano, L., Zhang, C.-Y., Krauss, S., Ranger, A.M., Datta, S.R., Greenberg, M.E., Licklider, L.J., Lowell, B.B., et al. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424, 952–956.

Danial, N.N., Walensky, L.D., Zhang, C.-Y., Choi, C.S., Fisher, J.K., Molina, A.J. a, Datta, S.R., Pitter, K.L., Bird, G.H., Wikstrom, J.D., et al. (2008). Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med* 14, 144–153.

Danoff, S.K., Ferris, C.D., Donath, C., Fischer, G.A., Munemitsu, S., Ullrich, A., Snyder, S.H., and Ross, C.A. (1991). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: distinct neuronal and nonneuronal forms derived by alternative splicing differ in phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2951–2955.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.

- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6, 41–51.
- De Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605–610.
- Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Guo, L., Hughes, C., Teijido, O., Ducret, T., Ichas, F., Korsmeyer, S.J., Antonsson, B., Jonas, E.A., et al. (2005). Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell* 16, 2424–2432.
- Del Bufalo, D., Biroccio, A., Leonetti, C., and Zupi, G. (1997). Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *FASEB J* 11, 947–953.
- Delfert, D.M., Hill, S., Pershadsingh, H.A., Sherman, W.R., and McDonald, J.M. (1986). myo-Inositol 1,4,5-trisphosphate mobilizes Ca^{2+} from isolated adipocyte endoplasmic reticulum but not from plasma membranes. *Biochem J* 236, 37–44.
- Delivani, P., Adrain, C., Taylor, R.C., Duriez, P.J., and Martin, S.J. (2006). Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics. *Mol Cell* 21, 761–773.
- Del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R., and Nuñez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687–689.
- Deng, H., Yu, F., Chen, J., Zhao, Y., Xiang, J., and Lin, A. (2008). Phosphorylation of Bad at Thr-201 by JNK1 promotes glycolysis through activation of phosphofructokinase-1. *J Biol Chem* 283, 20754–20760.
- Deng, X., Gao, F., Flagg, T., and May, W.S. (2004). Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 153–158.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (2001). Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* 8, 601–611.
- DeSouza, N., Reiken, S., Ondrias, K., Yang, Y.-M., Matkovich, S., and Marks, A.R. (2002). Protein kinase A and two phosphatases are components of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor macromolecular signaling complex. *J Biol Chem* 277, 39397–39400.
- DeSouza, N., Cui, J., Dura, M., McDonald, T. V., and Marks, A.R. (2007). A function for tyrosine phosphorylation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in lymphocyte activation. *J. Cell Biol.* 179, 923–934.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., and Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 336–342.
- Devogelaere, B., Beullens, M., Sammels, E., Derua, R., Waelkens, E., van Lint, J., Parys, J.B., Missiaen, L., Bollen, M., and De Smedt, H. (2007). Protein phosphatase-1 is a novel

regulator of the interaction between IRBIT and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J* 407, 303–311.

Devogelaere, B., Nadif Kasri, N., Derua, R., Waelkens, E., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J.B., and De Smedt, H. (2006). Binding of IRBIT to the IP3 receptor: determinants and functional effects. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 49–56.

Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C.L., Adams, J.M., and Kluck, R.M. (2009). Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their $\alpha 6$ helices. *Mol Cell* 36, 696–703.

Dewson, G., Kratina, T., Sim, H.W., Puthalakath, H., Adams, J.M., Colman, P.M., and Kluck, R.M. (2008). To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. *Mol Cell* 30, 369–380.

Dewson, G., Ma, S., Frederick, P., Hockings, C., Tan, I., Kratina, T., and Kluck, R.M. (2012). Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ* 19, 661–670.

Dikstein, S., Weller, C.P., and Sulman, F.G. (1963). Effect of calcium ions on melanophore dispersal. *Nature* 200, 1106.

Distelhorst, C.W., Lam, M., and McCormick, T.S. (1996). Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca^{2+} pool depletion. *Oncogene* 12, 2051–2055.

Domina, A.M., Vrana, J.A., Gregory, M.A., Hann, S.R., and Craig, R.W. (2004). MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* 23, 5301–5315.

Dosch, R., Wagner, D.S., Mintzer, K.A., Runke, G., Wiemelt, A.P., and Mullins, M.C. (2004). Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish I. *Dev Cell* 6, 771–780.

Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K^{+} conduction and selectivity. *Science* 280, 69–77.

Doyon, Y., McCammon, J.M., Miller, J.C., Faraji, F., Ngo, C., Katibah, G.E., Amora, R., Hocking, T.D., Zhang, L., Rebar, E.J., et al. (2008). Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology* 26, 702–708.

Dremina, E.S., Sharov, V.S., Kumar, K., Zaidi, A., Michaelis, E.K., and Schöneich, C. (2004). Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA). *Biochem J* 383, 361–370.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33–42.

Du, S., Draper, B.W., Mione, M., Moens, C.B., and Bruce, A. (2012). Differential regulation of epiboly initiation and progression by zebrafish Eomesodermin A. *Dev Biol* 362, 11–23.

Dyer, J.L., Mobasher, H., Lea, E.J., Dawson, A.P., and Michelangeli, F. (2003). Differential effect of PKA on the Ca²⁺ release kinetics of the type I and III InsP₃ receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302, 121–126.

Dzhagalov, I., St John, A., and He, Y.-W. (2007). The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* 109, 1620–1626.

Eckenrode, E.F., Yang, J., Velmurugan, G. V, Foskett, J.K., and White, C. (2010). Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem* 285, 13678–13684.

Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104–116.

Eguchi, K. (2001). Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med* 40, 275–284.

Ehrlich, B.E., and Watras, J. (1988). Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature* 336, 583–586.

Elrod, J.W., Wong, R., Mishra, S., Vagnozzi, R.J., Sakthivel, B., Goonasekera, S.A., Karch, J., Gabel, S., Farber, J., Force, T., et al. (2010). Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J Clin Invest* 120, 3680–3687.

Eno, C.O., Eckenrode, E.F., Olberding, K.E., Zhao, G., White, C., and Li, C. (2012). Distinct roles of mitochondria- and ER-localized Bcl-xL in apoptosis resistance and Ca²⁺ homeostasis. *Mol Biol Cell* 23, 2605–2618.

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20, 929–935.

Essner, J.J., Amack, J.D., Nyholm, M.K., Harris, E.B., and Yost, H.J. (2005). Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* 132, 1247–1260.

Ewings, K.E., Hadfield-Moorhouse, K., Wiggins, C.M., Wickenden, J.A., Balmanno, K., Gilley, R., Degenhardt, K., White, E., and Cook, S.J. (2007). ERK1/2-dependent phosphorylation of BimEL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL. *EMBO J* 26, 2856–2867.

Feng, B., Schwarz, H., and Jesuthasan, S. (2002). Furrow-specific endocytosis during cytokinesis of zebrafish blastomeres. *Exp Cell Res* 279, 14–20.

Ferrari, M.B., Rohrbough, J., and Spitzer, N.C. (1996). Spontaneous calcium transients regulate myofibrillogenesis in embryonic *Xenopus* myocytes. *Dev Biol* 178, 484–497.

- Ferris, C.D., Cameron, A.M., Bredt, D.S., Haganir, R.L., and Snyder, S.H. (1991a). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase at serines 1755 and 1589. *Biochem Biophys Res Commun* 175, 192–198.
- Ferris, C.D., Haganir, R.L., Bredt, D.S., Cameron, A.M., and Snyder, S.H. (1991b). Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2232–2235.
- Ferris, C.D., Haganir, R.L., and Snyder, S.H. (1990). Calcium flux mediated by purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in reconstituted lipid vesicles is allosterically regulated by adenine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2147–2151.
- Finch, E.A., Turner, T.J., and Goldin, S.M. (1991). Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science* 252, 443–446.
- Foskett, J.K., White, C., Cheung, K., and Mak, D.D. (2007). Inositol Trisphosphate Receptor Ca^{2+} Release Channels. *Physiol Rev* 87, 593–658.
- Fox, J.L., Ismail, F., Azad, A., Ternette, N., Leverrier, S., Edelmann, M.J., Kessler, B.M., Leigh, I.M., Jackson, S., and Storey, A. (2010). Tyrosine dephosphorylation is required for Bak activation in apoptosis. *EMBO J* 29, 3853–3868.
- Foyouzi-Youssefi, R., Arnaudeau, S., Borner, C., Kelley, W.L., Tschopp, J., Lew, D.P., Demarex, N., and Krause, K.H. (2000). Bcl-2 decreases the free Ca^{2+} concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5723–5728.
- Freisinger, C.M., Fisher, R.A., and Slusarski, D.C. (2010). Regulator of g protein signaling 3 modulates wnt5b calcium dynamics and somite patterning. *PLoS Genet* 6, e1001020.
- Fricke, M., O'Prey, J., Tolkovsky, A.M., and Ryan, K.M. (2010). Phosphorylation of Puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability. *Cell Death Dis* 1, e59.
- Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201–232.
- Fujii, S., Matsumoto, M., Igarashi, K., Kato, H., and Mikoshiba, K. (2000). Synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of mice lacking type 1 inositol-1,4,5-trisphosphate receptors. *Learn Mem* 7, 312–320.
- Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1989). Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 342, 32–38.
- Futatsugi, A., Nakamura, T., Yamada, M.K., Ebisui, E., Nakamura, K., Uchida, K., Kitaguchi, T., Takahashi-Iwanaga, H., Noda, T., Aruga, J., et al. (2005). IP3 receptor types 2 and 3 mediate exocrine secretion underlying energy metabolism. *Science* 309, 2232–2234.

- Gaiano, N., Amsterdam, A., Kawakami, K., Allende, M., Becker, T., and Hopkins, N. (1996). Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish. *Nature* 383, 829–832.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., and Barbas, C.F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31, 397–405.
- Gal, A., Pentelenyi, K., Remenyi, V., Wappler, E.A., Safrany, G., Skopal, J., and Nagy, Z. (2009). Bcl-2 or bcl-XL gene therapy increases neural plasticity proteins nestin and c-fos expression in PC12 cells. *Neurochem Int* 55, 349–353.
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noël, B., Hickman, J.A., Geneste, O., Cartron, P.-F., Vallette, F.M., Manon, S., et al. (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J Cell Biol* 185, 279–290.
- Galvan, D.L., Borrego-Diaz, E., Perez, P.J., and Mignery, G. a (1999). Subunit oligomerization, and topology of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 274, 29483–29492.
- Galvan, D.L., and Mignery, G. a (2002). Carboxyl-terminal sequences critical for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunit assembly. *J Biol Chem* 277, 48248–48260.
- Gao, G., and Dou, Q.P. (2000). N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem* 80, 53–72.
- Gardai, S.J., Hildeman, D. a, Frankel, S.K., Whitlock, B.B., Frasch, S.C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem* 279, 21085–21095.
- Garland, J.M., and Rudin, C. (1998). Cytochrome c induces caspase-dependent apoptosis in intact hematopoietic cells and overrides apoptosis suppression mediated by bcl-2, growth factor signaling, MAP-kinase-kinase, and malignant change. *Blood* 92, 1235–1246.
- George, N.M., Evans, J.J.D., and Luo, X. (2007). A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev* 21, 1937–1948.
- Germain, M., Mathai, J.P., and Shore, G.C. (2002). BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *J Biol Chem* 277, 18053–18060.
- Giam, M., Huang, D.C.S., and Bouillet, P. (2008). BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* 27, S128–36.
- Gibson, L., Holmgreen, S.P., Huang, D.C., Bernard, O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sutherland, G.R., Baker, E., Adams, J.M., and Cory, S. (1996). bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13, 665–675.

Gilland, E., Miller, A.L., Karplus, E., Baker, R., and Webb, S.E. (1999). Imaging of multicellular large-scale rhythmic calcium waves during zebrafish gastrulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 157–161.

Gillet, G., Guerin, M., Trembleau, A., and Brun, G. (1995). A Bcl-2-related gene is activated in avian cells transformed by the Rous sarcoma virus. *EMBO J* 14, 1372–1381.

Gillet, G., Michel, D., Crisanti, P., Guérin, M., Herault, Y., Pessac, B., Calothy, G., Brun, G., and Volovitch, M. (1993). Serum factors and v-src control two complementary mitogenic pathways in quail neuroretinal cells in culture. *Oncogene* 8, 565–574.

Gil-Parrado, S., Fernández-Montalván, A., Assfalg-Machleidt, I., Popp, O., Bestvater, F., Holloschi, A., Knoch, T.A., Auerswald, E.A., Welsh, K., Reed, J.C., et al. (2002). Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem* 277, 27217–27226.

Gincel, D., Zaid, H., and Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochemical Journal* 155, 147–155.

Giorgi, C., De Stefani, D., Bononi, A., Rizzuto, R., and Pinton, P. (2009). Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1817–1827.

Giorgi, C., Ito, K., Lin, H.-K., Santangelo, C., Wieckowski, M.R., Lebiedzinska, M., Bononi, A., Bonora, M., Duszynski, J., Bernardi, R., et al. (2010). PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science* 330, 1247–1251.

Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabó, I., et al. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5887–5892.

Giovannucci, D.R., Groblewski, G.E., Sneyd, J., and Yule, D.I. (2000). Targeted phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively inhibits localized Ca²⁺ release and shapes oscillatory Ca²⁺ signals. *J Biol Chem* 275, 33704–33711.

Glickman, N.S., Kimmel, C.B., Jones, M.A., and Adams, R.J. (2003). Shaping the zebrafish notochord. *Development* 130, 873–887.

Gogvadze, V., Robertson, J.D., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2001). Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 276, 19066–19071.

Graef, I.A., Chen, F., Chen, L., Kuo, A., and Crabtree, G.R. (2001). Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105, 863–875.

Greider, C., Chattopadhyay, A., Parkhurst, C., and Yang, E. (2002). BCL-x(L) and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 21, 7765–7775.

- Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., and Hickman, J.A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 144, 903–914.
- Grodsky, G.M., and Bennett, L.L. (1966). Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. *Diabetes* 15, 910–913.
- Guillemin, Y., Lalle, P., Gillet, G., Guerin, J.F., Hamamah, S., and Aouacheria, A. (2009). Oocytes and early embryos selectively express the survival factor BCL2L10. *J Mol Med* 87, 923–940.
- Gunter, T.E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R., and Gunter, K. (2000). Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28, 285–296.
- Gunter, T.E., Yule, D.I., Gunter, K.K., Eliseev, R.A., and Salter, J.D. (2004). Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* 567, 96–102.
- Haffter, P., and Nüsslein-Volhard, C. (1996). Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *Int J Dev Biol* 40, 221–227.
- Hajnóczky, G., Csordás, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Sinha Roy, S., and Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium* 40, 553–560.
- Hajnóczky, G., Gao, E., Nomura, T., Hoek, J.B., and Thomas, A.P. (1993). Multiple mechanisms by which protein kinase A potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ mobilization in permeabilized hepatocytes. *Biochem J* 293 (Pt 2, 413–422.
- Hajnóczky, G., Robb-Gaspers, L.D., Seitz, M.B., and Thomas, A.P. (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* 82, 415–424.
- Hamada, K., Terauchi, A., and Mikoshiba, K. (2003). Three-dimensional rearrangements within inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by calcium. *J Biol Chem* 278, 52881–52889.
- Hamasaki, A., Sendo, F., Nakayama, K., Ishida, N., Negishi, I., and Hatakeyama, S. (1998). Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J Exp Med* 188, 1985–1992.
- Hanada, M., Aimé-Sempé, C., Sato, T., and Reed, J.C. (1995). Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem* 270, 11962–11969.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hansen, M.R., Roehm, P.C., Xu, N., and Green, S.H. (2006). Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL Prevents Spiral Ganglion Neuron Death and Inhibits Neurite Growth. *Dev Neurobiol* 3, 316–325.
- Hanson, C.J., Bootman, M.D., Distelhorst, C.W., Wojcikiewicz, R.J.H., and Roderick, H.L. (2008). Bcl-2 suppresses Ca²⁺ release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and

inhibits Ca^{2+} uptake by mitochondria without affecting ER calcium store content. *Cell Calcium* 44, 324–338.

Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L.J., Taylor, S.S., Scott, J.D., and Korsmeyer, S.J. (1999). Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 3, 413–422.

Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A., and Korsmeyer, S.J. (2004). Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15313–15317.

Haug, L.S., Walaas, S.I., and Ostvold, a C. (2000). Degradation of the type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by caspase-3 in SH-SY5Y neuroblastoma cells undergoing apoptosis. *J Neurochem* 75, 1852–1861.

Haynes, L.P., Tepikin, A. V, and Burgoyne, R.D. (2004). Calcium-binding protein 1 is an inhibitor of agonist-evoked, inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 547–555.

He, H., Lam, M., McCormick, T.S., and Distelhorst, C.W. (1997). Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. *J Cell Biol* 138, 1219–1228.

Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saúde, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., and Wilson, S.W. (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405, 76–81.

Hengartner, M.O., and Horvitz, H.R. (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665–676.

Henley, J., and Poo, M. (2004). Guiding neuronal growth cones using Ca^{2+} signals. *Trends Cell Biol* 14, 320–330.

Hilton, M., Middleton, G., and Davies, A.M. (1997). Bcl-2 influences axonal growth rate in embryonic sensory neurons. *Curr Biol* 7, 798–800.

Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2005). Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell* 120, 85–98.

Hirata, H., Lopes, G.S., Jurkiewicz, A., Garcez-do-Carmo, L., and Smaili, S.S. (2012). Bcl-2 modulates endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium stores in PC12 cells. *Neurochem Res* 37, 238–243.

Hirota, J., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999a). Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 Is a Substrate for Caspase-3 and Is Cleaved during Apoptosis in a Caspase-3-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* 274, 34433–34437.

Hirota, J., Michikawa, T., Natsume, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999b). Calmodulin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release through the purified and reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *FEBS Lett* 456, 322–326.

- Hirota, J., Ando, H., Hamada, K., and Mikoshiba, K. (2003). Carbonic anhydrase-related protein is a novel binding protein for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *Biochem. J.* *372*, 435–441.
- Hockenbery, D., Nuñez, G., Millman, C., Schreiber, R.D., and Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* *348*, 334–336.
- Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M., and Korsmeyer, S.J. (1991). BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 6961–6965.
- Holloway, B.A., Gomez De La Torre Canny, S., Ye, Y., Slusarski, D.C., Freisinger, C.M., Dosch, R., Chou, M.M., Wagner, D.S., and Mullins, M.C. (2009). A Novel Role for MAPKAPK2 in Morphogenesis during Zebrafish Development. *PLoS Genetics* *5*, 14.
- Hoppins, S., Edlich, F., Cleland, M.M., Banerjee, S., McCaffery, J.M., Youle, R.J., and Nunnari, J. (2011). The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol Cell* *41*, 150–160.
- Hsieh, D.J.-Y., and Liao, C.-F. (2002). Zebrafish M2 muscarinic acetylcholine receptor: cloning, pharmacological characterization, expression patterns and roles in embryonic bradycardia. *Br J Pharmacol* *137*, 782–792.
- Hsu, H.-J., Liang, M.-R., Chen, C.-T., and Chung, B. (2006). Pregnenolone stabilizes microtubules and promotes zebrafish embryonic cell movement. *Nature* *439*, 480–483.
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A.J. (1997a). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12401–12406.
- Hsu, Y.-T., Wolter, K.G., and Youle, R.J. (1997b). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-xL during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 3668–3672.
- Huang, D.C., Adams, J.M., and Cory, S. (1998). The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J* *17*, 1029–1039.
- Huang, D.C., O'Reilly, L.A., Strasser, A., and Cory, S. (1997). The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J* *16*, 4628–4638.
- Huang, H., Hu, X., Eno, C.O., Zhao, G., Li, C., and White, C. (2013). An Interaction between Bcl-xL and VDAC Promotes Mitochondrial Ca²⁺ Uptake. *Journal of Biological Chemistry* *288*, 19870–19881.
- Huang, P., Xiao, A., Zhou, M., Zhu, Z., Lin, S., and Zhang, B. (2011). Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol* *29*, 699–700.

Hüser, J., and Blatter, L.A. (1999). Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore. *Biochem J* 343 Pt 2, 311–317.

Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.-R.J., and Joung, J.K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31, 227–229.

Ichimiya, M., Chang, S.H., Liu, H., Berezesky, I.K., Trump, B.F., and Amstad, P.A. (1998). Effect of Bcl-2 on oxidant-induced cell death and intracellular Ca²⁺ mobilization. *Am J Physiol* 275, C832–9.

Ikegami, R., Hunter, P., and Yager, T.D. (1999). Developmental activation of the capability to undergo checkpoint-induced apoptosis in the early zebrafish embryo. *Dev Biol* 209, 409–433.

Ikegami, R., Zhang, J., Rivera-Bennetts, A.K., and Yager, T.D. (1997). Activation of the metaphase checkpoint and an apoptosis programme in the early zebrafish embryo, by treatment with the spindle-destabilising agent nocodazole. *Zygote* 5, 329–350.

Inohara, N., Ding, L., Chen, S., and Núñez, G. (1997). harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 16, 1686–1694.

Inohara, N., Gourley, T.S., Carrio, R., Muñiz, M., Merino, J., Garcia, I., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., and Núñez, G. (1998). Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem* 273, 32479–32486.

Inoue, T., Kato, K., Kohda, K., and Mikoshiba, K. (1998). Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required for induction of long-term depression in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 18, 5366–5373.

Irvine, R.F. (1990). “Quantal” Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett* 263, 5–9.

Ito, J., Yoon, S.-Y., Lee, B., Vanderheyden, V., Vermassen, E., Wojcikiewicz, R., Alfandari, D., De Smedt, H., Parys, J.B., and Fissore, R.A. (2008). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1, a widespread Ca²⁺ channel, is a novel substrate of polo-like kinase 1 in eggs. *Dev. Biol.* 320, 402–413.

Ito, T., Deng, X., Carr, B., and May, W.S. (1997). Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem* 272, 11671–11673.

Iwai, M., Michikawa, T., Bosanac, I., Ikura, M., and Mikoshiba, K. (2007). Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem* 282, 12755–12764.

Janumyan, Y., Cui, Q., Yan, L., Sansam, C.G., Valentin, M., and Yang, E. (2008). G0 function of BCL2 and BCL-xL requires BAX, BAK, and p27 phosphorylation by Mirk, revealing a novel role of BAX and BAK in quiescence regulation. *J Biol Chem* 283, 34108–34120.

Janumyan, Y.M., Sansam, C.G., Chattopadhyay, A., Cheng, N., Soucie, E.L., Penn, L.Z., Andrews, D., Knudson, C.M., and Yang, E. (2003). Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *EMBO J* 22, 5459–5470.

Jayaraman, T., Ondrias, K., Ondriasová, E., and Marks, A.R. (1996). Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science* 272, 1492–1494.

Jayaraman, T., and Marks, A.R. (1997). T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis. *Mol Cell Biol* 17, 3005–3012.

Jeong, S.-Y., Gaume, B., Lee, Y.-J., Hsu, Y.-T., Ryu, S.-W., Yoon, S.-H., and Youle, R.J. (2004). Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. *EMBO J* 23, 2146–2155.

Jette, C. a, Flanagan, a M., Ryan, J., Pyati, U.J., Carbonneau, S., Stewart, R. a, Langenau, D.M., Look, a T., and Letai, a (2008). BIM and other BCL-2 family proteins exhibit cross-species conservation of function between zebrafish and mammals. *Cell Death Differ* 15, 1063–1072.

Jiang, D., Zhao, L., and Clapham, D.E. (2009). Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Science* 326, 144–147.

Jiang, Q.-X., Thrower, E.C., Chester, D.W., Ehrlich, B.E., and Sigworth, F.J. (2002). Three-dimensional structure of the type 1 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor at 24 Å resolution. *EMBO J* 21, 3575–3581.

Jiao, J., Huang, X., Feit-Leithman, R.A., Neve, R.L., Snider, W., Dartt, D.A., and Chen, D.F. (2005). Bcl-2 enhances Ca(2+) signaling to support the intrinsic regenerative capacity of CNS axons. *EMBO J* 24, 1068–1078.

Jin, M., Guan, C., Jiang, Y., Chen, G., Zhao, C., Cui, K., Song, Y., Wu, C., Poo, M., and Yuan, X. (2005). Ca²⁺-dependent regulation of rho GTPases triggers turning of nerve growth cones. *J Neurosci* 25, 2338–2347.

Jones, R.G., Bui, T., White, C., Madesh, M., Krawczyk, C.M., Lindsten, T., Hawkins, B.J., Kubek, S., Frauwirth, K.A., Wang, Y.L., et al. (2007). The proapoptotic factors Bax and Bak regulate T Cell proliferation through control of endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis. *Immunity* 27, 268–280.

Joseph, S.K., Boehning, D., Pierson, S., and Nicchita, C. V (1997). Membrane Insertion, Glycosylation, and Oligomerization of Inositol Trisphosphate Receptors in a Cell-free Translation System. *J Biol Chem* 272, 1579–1588.

Joseph, S.K., Brownell, S., and Khan, M.T. (2005). Calcium regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 38, 539–546.

Joseph, S.K., Lin, C., Pierson, S., Thomas, A.P., and Maranto, A.R. (1995a). Heteroligomers of type-I and type-III inositol trisphosphate receptors in WB rat liver epithelial cells. *J Biol Chem* 270, 23310–23316.

Joseph, S.K., Pierson, S., and Samanta, S. (1995b). Trypsin digestion of the inositol trisphosphate receptor: implications for the conformation and domain organization of the protein. *Biochem J* 865, 859–865.

Joseph, S.K., Thomas, A.P., Williams, R.J., Irvine, R.F., and Williamson, J.R. (1984). myo-Inositol 1,4,5-trisphosphate. A second messenger for the hormonal mobilization of intracellular Ca^{2+} in liver. *J Biol Chem* 259, 3077–3081.

Kane, D.A., and Kimmel, C.B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development* 119, 447–456.

Kane, D.A., McFarland, K.N., and Warga, R.M. (2005). Mutations in half baked/E-cadherin block cell behaviors that are necessary for teleost epiboly. *Development* 132, 1105–1116.

Kaplin, A.I., Snyder, S.H., and Linden, D.J. (1996). Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Selective Receptors Mediates Mobilization of Calcium Stimulation Hypoxic. *J. Neurosci.* 16, 2002–2011.

Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.-Y., and Youle, R.J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443, 658–662.

Kasri, N.N., Bultynck, G., Smyth, J., Szlufcik, K., Parys, J.B., Callewaert, G., Missiaen, L., Fissore, R. a, Mikoshiba, K., and de Smedt, H. (2004a). The N-terminal Ca^{2+} -independent calmodulin-binding site on the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is responsible for calmodulin inhibition, even though this inhibition requires Ca^{2+} . *Mol Pharmacol* 66, 276–284.

Kasri, N.N., Holmes, A.M., Bultynck, G., Parys, J.B., Bootman, M.D., Rietdorf, K., Missiaen, L., McDonald, F., De Smedt, H., Conway, S.J., et al. (2004b). Regulation of InsP3 receptor activity by neuronal Ca^{2+} -binding proteins. *EMBO J.* 23, 312–321.

Kettleborough, R.N., Bruijn, E., Eeden, F., Cuppen, E., and Stemple, D.L. (2011). High-throughput target-selected gene inactivation in zebrafish. *Methods Cell Biol* 104, 121–127.

Khan, M.T., Wagner, L., Yule, D.I., Bhanumathy, C., and Joseph, S.K. (2006). Akt kinase phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 281, 3731–3737.

Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y.N., Campbell, A., Sudha, T., et al. (2000). Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem* 275, 322–327.

Kilian, B., Mansukoski, H., Barbosa, F.C., Ulrich, F., Tada, M., and Heisenberg, C.P. (2003). The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech Dev* 120, 467–476.

Kim, B.-J., Ryu, S.-W., and Song, B.-J. (2006). JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 281, 21256–21265.

- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253–310.
- Kimmel, C.B., and Law, R.D. (1985). Cell lineage of zebrafish blastomeres. II. Formation of the yolk syncytial layer. *Dev Biol* 108, 86–93.
- Kirsch, D.G., Doseff, A., Chau, B.N., Lim, D.S., de Souza-Pinto, N.C., Hansford, R., Kastan, M.B., Lazebnik, Y.A., and Hardwick, J.M. (1999). Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem* 274, 21155–21161.
- Klee, M., Pallauf, K., Alcalá, S., Fleischer, A., and Pimentel-Muiños, F.X. (2009). Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. *EMBO J* 28, 1757–1768.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132–1136.
- Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96–99.
- Knust, E., and Bossinger, O. (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* 298, 1955–1959.
- Kobrinisky, E.M., and Kirchberger, M.A. (2001). Evidence for a role of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in thapsigargin and Bcl-2 induced changes in *Xenopus laevis* oocyte maturation. *Oncogene* 20, 933–941.
- Konishi, Y., Lehtinen, M., Donovan, N., and Bonni, A. (2002). Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Mol Cell* 9, 1005–1016.
- Koos, D.S., and Ho, R.K. (1998). The *nieuwkoid* gene characterizes and mediates a Nieuwkoop-center-like activity in the zebrafish. *Curr Biol* 8, 1199–1206.
- Köppen, M., Fernández, B.G., Carvalho, L., Jacinto, A., and Heisenberg, C.-P. (2006). Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and *Drosophila*. *Development* 133, 2671–2681.
- Korsmeyer, S.J., Shutter, J.R., Veis, D.J., Merry, D.E., and Oltvai, Z.N. (1993). Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4, 327–332.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., and Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3516–3520.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K., and Reed, J.C. (1995). Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol* 146, 1309–1319.

Krajewski, S., Krajewska, M., and Reed, J.C. (1996). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer Res* 56, 2849–2855.

Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Miyashita, T., Wang, H.G., and Reed, J.C. (1994a). Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 145, 1323–1336.

Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Wang, H.G., Irie, S., Fong, L., and Reed, J.C. (1994b). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* 54, 5501–5507.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., and Reed, J.C. (1993). Investigation of the Subcellular Distribution of the bcl-2 Oncoprotein: Residence in the Nuclear Envelope, Endoplasmic Reticulum, and Outer Mitochondrial Membranes. *Cancer Res* 53, 4701–4714.

Kratz, E., Eimon, P.M., Mukhyala, K., Stern, H., Zha, J., Strasser, a, Hart, R., and Ashkenazi, a (2006). Functional characterization of the Bcl-2 gene family in the zebrafish. *Cell Death Differ* 13, 1631–1640.

Kreiling, J.A., Balantac, Z.L., Crawford, A.R., Ren, Y., Toure, J., Zchut, S., Kochilas, L., and Creton, R. (2008). Suppression of the endoplasmic reticulum calcium pump during zebrafish gastrulation affects left-right asymmetry of the heart and brain. *Mech Dev* 125, 396–410.

Kucharczak, J.F., Simmons, M.J., Duckett, C.S., and Gélinas, C. (2005). Constitutive proteasome-mediated turnover of Bfl-1/A1 and its processing in response to TNF receptor activation in FL5.12 pro-B cells convert it into a prodeath factor. *Cell Death Differ* 12, 1225–1239.

Kühl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., and Moon, R.T. (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16, 279–283.

Kuo, T.H., Kim, H.R., Zhu, L., Yu, Y., Lin, H.M., and Tsang, W. (1998). Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2. *Oncogene* 17, 1903–1910.

Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331–342.

Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W.D., Czabotar, P.E., Fischer, S.F., Perugini, M.A., Huang, D.C.S., and Colman, P.M. (2008). Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ* 15, 1564–1571.

Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nuñez, G., Miesfeld, R.L., and Distelhorst, C.W. (1994). Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6569–6573.

- Lam, P.Y., Webb, S.E., Leclerc, C., Moreau, M., and Miller, A.L. (2009). Inhibition of stored Ca^{2+} release disrupts convergence-related cell movements in the lateral intermediate mesoderm resulting in abnormal positioning and morphology of the pronephric anlagen in intact zebrafish embryos. *Dev Growth Differ* 51, 429–442.
- Lambaerts, K., Van Dyck, S., Mortier, E., Ivarsson, Y., Degeest, G., Luyten, A., Vermeiren, E., Peers, B., David, G., and Zimmermann, P. (2012). Syntenin, a syndecan adaptor and an Arf6 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate effector, is essential for epiboly and gastrulation cell movements in zebrafish. *J Cell Sci* 125, 1129–1140.
- Latimer, A., and Jessen, J.R. (2010). Extracellular matrix assembly and organization during zebrafish gastrulation. *Matrix Biol* 29, 89–96.
- Lawson, N.D., and Wolfe, S.A. (2011). Forward and reverse genetic approaches for the analysis of vertebrate development in the zebrafish. *Dev Cell* 21, 48–64.
- LeBeau, A.P., Yule, D.I., Groblewski, G.E., and Sneyd, J. (1999). Agonist-dependent Phosphorylation of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor . A Possible Mechanism for Agonist-specific Calcium Oscillations in Pancreatic Acinar Cells. *The Journal of General Physiology* 113, 851–872.
- Leclerc, C., Webb, S.E., Daguzan, C., Moreau, M., and Miller, A.L. (2000). Imaging patterns of calcium transients during neural induction in *Xenopus laevis* embryos. *J Cell Sci* 113 Pt 19, 3519–3529.
- Lee, B., Vermassen, E., Yoon, S.-Y., Vanderheyden, V., Ito, J., Alfandari, D., De Smedt, H., Parys, J.B., and Fissore, R.A. (2006). Phosphorylation of IP3R1 and the regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses at fertilization: a role for the MAP kinase pathway. *Development* 133, 4355–4365.
- Lee, K.W., Ho, S.M., Wong, C.H., Webb, S.E., and Miller, A.L. (2004). Characterization of mid-spindle microtubules during furrow positioning in early cleavage period zebrafish embryos. *Zygote* 12, 221–230.
- Lee, K.W., Webb, S.E., and Miller, A.L. (1999a). A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation. *Dev Biol* 214, 168–180.
- Lee, K.W., Webb, S.E., and Miller, A.L. (2003). Ca^{2+} released via IP3 receptors is required for furrow deepening during cytokinesis in zebrafish embryos. *Int J Dev Biol* 47, 411–421.
- Lee, K.W., Webb, S.E., and Miller, A.L. (2006). Requirement for a localized, IP3R-generated Ca^{2+} transient during the furrow positioning process in zebrafish zygotes. *Zygote* 14, 143–155.
- Lee, R.M., Gillet, G., Burnside, J., Thomas, S.J., and Neiman, P. (1999b). Role of Nr13 in regulation of programmed cell death in the bursa of Fabricius. *Genes Dev* 13, 718–728.
- Lei, K., and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2432–2437.

- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183–192.
- Leung, C.F., Miller, A.L., Korzh, V., Chong, S.-W., Sleptsova-Freidrich, I., and Webb, S.E. (2009). Visualization of stochastic Ca²⁺ signals in the formed somites during the early segmentation period in intact, normally developing zebrafish embryos. *Dev Growth Differ* 51, 617–637.
- Leung, C.F., Webb, S.E., and Miller, A.L. (2000). On the mechanism of ooplasmic segregation in single-cell zebrafish embryos. *Dev Growth Differ* 42, 29–40.
- Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C., and Cook, S.J. (2003). Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* 278, 18811–18816.
- Li, C., Wang, X., Vais, H., Thompson, C.B., Foskett, J.K., and White, C. (2007). Apoptosis regulation by Bcl-x(L) modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12565–12570.
- Li, C., Chan, J., Haeseleer, F., Mikoshiba, K., Palczewski, K., Ikura, M., and Ames, J.B. (2009). Structural insights into Ca²⁺-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by CaBP1. *J. Biol. Chem.* 284, 2472–2481.
- Li, C., Enomoto, M., Rossi, A.M., Seo, M.-D., Rahman, T., Stathopoulos, P.B., Taylor, C.W., Ikura, M., and Ames, J.B. (2013). CaBP1, a neuronal Ca²⁺ sensor protein, inhibits inositol trisphosphate receptors by clamping intersubunit interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8507–8512.
- Li, F., Srinivasan, A., Wang, Y., Armstrong, R.C., Tomaselli, K.J., and Fritz, L.C. (1997). Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J Biol Chem* 272, 30299–30305.
- Li, H., Cook, J.D., Terry, M., Spitzer, N.C., and Ferrari, M.B. (2004). Calcium transients regulate patterned actin assembly during myofibrillogenesis. *Dev Dyn* 229, 231–242.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491–501.
- Li, J., and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194–6206.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95–99.
- Li, N., Wang, C., Wu, Y., Liu, X., and Cao, X. (2009). Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II promotes cell cycle progression by directly activating MEK1 and subsequently modulating p27 phosphorylation. *J Biol Chem* 284, 3021–3027.
- Li, W.M., Webb, S.E., Chan, C.M., and Miller, A.L. (2008). Multiple roles of the furrow deepening Ca²⁺ transient during cytokinesis in zebrafish embryos. *Dev Biol* 316, 228–248.

Lien, R., Flaisher-Grinberg, S., Cleary, C., Hejny, M., and Einat, H. (2008). Behavioral effects of Bcl-2 deficiency: implications for affective disorders. *Pharmacol Rep* 60, 490–498.

Lieschke, G.J., and Currie, P.D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics* 8, 353–367.

Lin, C., Widjaja, J., and Joseph, S.K. (2000). The interaction of calmodulin with alternatively spliced isoforms of the type-I inositol trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 275, 2305–2311.

Lin, E.Y., Orlofsky, A., Berger, M.S., and Prystowsky, M.B. (1993). Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* 151, 1979–1988.

Lin, F., Chen, S., Sepich, D.S., Panizzi, J.R., Clendenon, S.G., Marrs, J.A., Hamm, H.E., and Solnica-Krezel, L. (2009). α 12/13 regulate epiboly by inhibiting E-cadherin activity and modulating the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 184, 909–921.

Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., et al. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389–1399.

Linette, G.P., Li, Y., Roth, K., and Korsmeyer, S.J. (1996). Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9545–9552.

Linseman, D.A., Butts, B.D., Precht, T.A., Phelps, R.A., Le, S.S., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., Florez-McClure, M.L., and Heidenreich, K.A. (2004). Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci* 24, 9993–10002.

Lopez, J., Hesling, C., Prudent, J., Popgeorgiev, N., Gadet, R., Mikaelian, I., Rimokh, R., Gillet, G., and Gonzalo, P. (2012). Src tyrosine kinase inhibits apoptosis through the Erk1/2-dependent degradation of the death accelerator Bik. *Cell Death Differ* 19, 1459–1469.

Lu, P.J., Gou, D.M., Shieh, W.R., and Chen, C.S. (1994). Molecular interactions of endogenous D-myo-inositol phosphates with the intracellular D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate recognition site. *Biochemistry* 33, 11586–11597.

Lu, Y., Rolland, S.G., and Conradt, B. (2011). A molecular switch that governs mitochondrial fusion and fission mediated by the BCL2-like protein CED-9 of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E813–22.

Luciano, F., Jacquel, A., Colosetti, P., Herrant, M., Cagnol, S., Pages, G., and Auberger, P. (2003). Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 22, 6785–6793.

Ludtke, S.J., Tran, T.P., Ngo, Q.T., Moiseenkova-Bell, V.Y., Chiu, W., and Serysheva, I.I. (2011). Flexible architecture of IP3R1 by Cryo-EM. *Structure* 19, 1192–1199.

Ludwinski, M.W., Sun, J., Hilliard, B., Gong, S., Xue, F., Carmody, R.J., DeVigiliis, J., and Chen, Y.H. (2009). Critical roles of Bim in T cell activation and T cell-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* 119, 1706–1713.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481–490.

Lyman Gingerich, J., Westfall, T.A., Slusarski, D.C., and Pelegri, F. (2005). *hecate*, a zebrafish maternal effect gene, affects dorsal organizer induction and intracellular calcium transient frequency. *Dev Biol* 286, 427–439.

Lynch, P.J., Tong, J., Lehane, M., Mallet, A., Giblin, L., Heffron, J.J.A., Vaughan, P., Zafra, G., MacLennan, D.H., and McCarthy, T. V. (1999). A mutation in the transmembrane/luminal domain of the ryanodine receptor is associated with abnormal Ca²⁺ release channel function and severe central core disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 4164–4169.

Ma, L.H., Webb, S.E., Chan, C.M., Zhang, J., and Miller, A.L. (2009). Establishment of a transitory dorsal-biased window of localized Ca²⁺ signaling in the superficial epithelium following the mid-blastula transition in zebrafish embryos. *Dev Biol* 327, 143–157.

Machado-Vieira, R., Pivovarov, N.B., Stanika, R.I., Yuan, P., Wang, Y., Zhou, R., Zarate, C.A., Drevets, W.C., Brantner, C.A., Baum, A., et al. (2011). The Bcl-2 gene polymorphism rs956572AA increases inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated endoplasmic reticulum calcium release in subjects with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 69, 344–352.

Maeda, N., Kawasaki, T., Nakade, S., Yokota, N., Taguchi, T., Kasai, M., and Mikoshiba, K. (1991). Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. *J Biol Chem* 266, 1109–1116.

Maes, K., Missiaen, L., Parys, J.B., Sienaert, I., Bultynck, G., Zizi, M., De Smet, P., Casteels, R., and De Smedt, H. (1999). Adenine-nucleotide binding sites on the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor bind caffeine, but not adenophostin A or cyclic ADP-ribose. *Cell Calcium* 25, 143–152.

Maes, K., Missiaen, L., De Smet, P., Vanlingen, S., Callewaert, G., Parys, J.B., and De Smedt, H. (2000). Differential modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 and type 3 by ATP. *Cell Calcium* 27, 257–267.

Magnelli, L., Cinelli, M., Turchetti, A., and Chiarugi, V.P. (1994). Bcl-2 overexpression abolishes early calcium waving preceding apoptosis in NIH-3T3 murine fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 204, 84–90.

Mak, D.D., McBride, S., and Foskett, J.K. (2001a). Regulation by Ca²⁺ and Inositol 1,4,5-Trisphosphate (InsP₃) of Single Recombinant Type 3 InsP₃ Receptor Channels: Ca²⁺ Activation Uniquely Distinguishes Types 1 and 3 InsP₃ Receptors. *J Gen Physiol* 117, 435–446.

- Mak, D.O., McBride, S., and Foskett, J.K. (1999). ATP regulation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel gating by allosteric tuning of Ca^{2+} activation. *J Biol Chem* 274, 22231–22237.
- Mak, D.O., McBride, S., and Foskett, J.K. (2001b). ATP regulation of recombinant type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gating. *J Gen Physiol* 117, 447–456.
- Mak, D.-O.D., McBride, S., and Foskett, J.K. (1998). Inositol 1,4,5-trisphosphate activation of inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} channel by ligand tuning of Ca^{2+} inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 15821–15825.
- Mak, D.-O.D., McBride, S.M.J., and Foskett, J.K. (2003). Spontaneous channel activity of the inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor (InsP3R). Application of allosteric modeling to calcium and InsP3 regulation of InsP3R single-channel gating. *J Gen Physiol* 122, 583–603.
- Malathi, K., Kohyama, S., Ho, M., Soghoian, D., Li, X., Silane, M., Berenstein, A., and Jayaraman, T. (2003). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (type 1) phosphorylation and modulation by Cdc2. *J. Cell. Biochem.* 90, 1186–1196.
- Malathi, K., Li, X., Krizanov, O., Ondrias, K., Sperber, K., Ablamunits, V., and Jayaraman, T. (2005). Cdc2/cyclin B1 interacts with and modulates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (type 1) functions. *J. Immunol.* 175, 6205–6210.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826.
- Marchant, J.S., and Taylor, C.W. (1997). Cooperative activation of IP3 receptors by sequential binding of IP3 and Ca^{2+} safeguards against spontaneous activity. *Curr Biol* 7, 510–518.
- Marchi, S., Rimessi, A., Giorgi, C., Baldini, C., Ferroni, L., Rizzuto, R., and Pinton, P. (2008). Akt kinase reducing endoplasmic reticulum Ca^{2+} release protects cells from Ca^{2+} -dependent apoptotic stimuli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 501–505.
- Marlow, F., Topczewski, J., Sepich, D., and Solnica-Krezel, L. (2002). Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Curr Biol* 12, 876–884.
- Marshall, I.C., and Taylor, C.W. (1993). Biphasic effects of cytosolic Ca^{2+} on Ins(1,4,5)P3-stimulated Ca^{2+} mobilization in hepatocytes. *J Biol Chem* 268, 13214–13220.
- Martinez, J.A., Zhang, Z., Svetlov, S.I., Hayes, R.L., Wang, K.K., and Larner, S.F. (2010). Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis* 15, 1480–1493.
- Martinez-Caballero, S., Dejean, L.M., Kinnally, M.S., Oh, K.J., Mannella, C.A., and Kinnally, K.W. (2009). Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *J Biol Chem* 284, 12235–12245.

Mathai, J.P., Germain, M., and Shore, G.C. (2005). BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J Biol Chem* 280, 23829–23836.

Matifat, F., Hague, F., Brûlé, G., and Collin, T. (2001). Regulation of InsP3-mediated Ca²⁺ release by CaMKII in *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* 441, 796–801.

Matsumoto, M., Nakagawa, T., Inoue, T., Nagata, E., Tanaka, K., Takano, H., Minowa, O., Kuno, J., Sakakibara, S., Yamada, M., et al. (1996). Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Nature* 379, 168–171.

Matter, N., Ritz, M., Freyermuth, S., Rogue, P., and Malviya, A. (1993). Stimulation of nuclear protein kinase C leads to phosphorylation of nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and accelerated calcium release by inositol 1,4,5-trisphosphate from isolated rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.* 268, 732–736.

Mattson, M.P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430, 631–639.

Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E., and Green, D.R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 21, 749–760.

Maxwell, J.T., Natesan, S., and Mignery, G. a (2012). Modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 channel activity by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 287, 39419–39428.

McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., and Cowburn, D. (1999). Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 96, 625–634.

Meier, P.J., Spycher, M.A., and Meyer, U.A. (1981). Isolation and characterization of rough endoplasmic reticulum associated with mitochondria from normal rat liver. *Biochim Biophys Acta* 646, 283–297.

Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J.B., De Smedt, H., and Missiaen, L. (2011). Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3,

Mérino, D., Giam, M., Hughes, P.D., Siggs, O.M., Heger, K., O'Reilly, L.A., Adams, J.M., Strasser, A., Lee, E.F., Fairlie, W.D., et al. (2009). The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J Cell Biol* 186, 355–362.

Merry, D.E., Veis, D.J., Hickey, W.F., and Korsmeyer, S.J. (1994). bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* 120, 301–311.

Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190.

- Michell, R.H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta* 415, 81–47.
- Michikawa, T., Hamanaka, H., Otsu, H., Yamamoto, A., Miyawaki, A., Furuichi, T., Tashiro, Y., and Mikoshiba, K. (1994). Transmembrane Topology and Sites of N-Glycosylation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *J Biol Chem* 269, 9184–9189.
- Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiraoka, M., Yamada, M., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999). Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of the cerebellar type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 23, 799–808.
- Mignery, G. a, and Südhof, T.C. (1990). The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor. *EMBO J* 9, 3893–3898.
- Mignery, G.A., Südhof, T.C., Takei, K., and De Camilli, P. (1989). Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* 342, 192–195.
- Mikoshiba, K., Huchet, M., and Changeux, J.P. (1979). Biochemical and immunological studies on the P400 protein, a protein characteristic of the Purkinje cell from mouse and rat cerebellum. *Dev Neurosci* 2, 254–275.
- Mikoshiba, K., Okano, H., and Tsukada, Y. (1985). P400 protein characteristic to Purkinje cells and related proteins in cerebella from neuropathological mutant mice: autoradiographic study by ¹⁴C-leucine and phosphorylation. *Dev Neurosci* 7, 179–187.
- Milner, R.D., and Hales, C.N. (1967). The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied in vitro. *Diabetologia* 3, 47–49.
- Missiaen, L., Parys, J.B., Smedt, H.D., Sienaert, I., Sipma, H., Vanlingen, S., Maes, K., and Casteels, R. (1997). Effect of adenine nucleotides on myo-inositol-1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Biochem J* 325 (Pt 3, 661–666.
- Missiaen, L., Parys, J.B., Weidema, A.F., Sipma, H., Vanlingen, S., De Smet, P., Callewaert, G., and De Smedt, H. (1999). The bell-shaped Ca²⁺ dependence of the inositol 1,4, 5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release is modulated by Ca²⁺/calmodulin. *J Biol Chem* 274, 13748–13751.
- Missiaen, L., De Smedt, H., Bultynck, G., Vanlingen, S., Desmet, P., Callewaert, G., and Parys, J.B. (2000). Calmodulin increases the sensitivity of type 3 inositol-1,4, 5-trisphosphate receptors to Ca(2+) inhibition in human bronchial mucosal cells. *Mol Pharmacol* 57, 564–567.
- Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J.B., and Casteels, R. (1994). Co-activation of inositol trisphosphate-induced Ca²⁺ release by cytosolic Ca²⁺ is loading-dependent. *J Biol Chem* 269, 7238–7242.
- Miyagi, C., Yamashita, S., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Matsuda, M., and Hirano, T. (2004). STAT3 noncell-autonomously controls planar cell polarity during zebrafish convergence and extension. *J Cell Biol* 166, 975–981.

Miyakawa, T., Mizushima, a, Hirose, K., Yamazawa, T., Bezprozvanny, I., Kurosaki, T., and Iino, M. (2001). Ca(2+)-sensor region of IP(3) receptor controls intracellular Ca(2+) signaling. *EMBO J* 20, 1674–1680.

Miyawaki, A., Furuichi, T., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1990). Expressed cerebellar-type inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, P400, has calcium release activity in a fibroblast L cell line. *Neuron* 5, 11–18.

Miyawaki, A., Furuichi, T., Ryou, Y., Yoshikawa, S., Nakagawa, T., Saitoh, T., and Mikoshiba, K. (1991). Structure-function relationships of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4911–4915.

Mollinedo, F., and Gajate, C. (2006). Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resist Updat* 9, 51–73.

Monaco, G., Beckers, M., Ivanova, H., Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H., and Bultynck, G. (2012a). Profiling of the Bcl-2/Bcl-XL-binding sites on type 1 IP3 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 428, 31–35.

Monaco, G., Decrock, E., Akl, H., Ponsaerts, R., Vervliet, T., Luyten, T., De Maeyer, M., Missiaen, L., Distelhorst, C.W., De Smedt, H., et al. (2012b). Selective regulation of IP3-receptor-mediated Ca²⁺ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-XL. *Cell Death Differ* 19, 295–309.

Monkawa, T., Miyawaki, A., Sugiyama, T., Yoneshima, H., Yamamoto-Hino, M., Furuichi, T., Saruta, T., Hasegawa, M., and Mikoshiba, K. (1995). Heterotetrameric Complex Formation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Subunits. *J Biol Chem* 270, 14700–14704.

Montessuit, S., Somasekharan, S.P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., Manstein, D.J., Bossy-Wetzel, E., Basañez, G., Meda, P., et al. (2010). Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* 142, 889–901.

Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G. V, and Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5, 691–701.

Moradi-Améli, M., Lorca, T., Ficheux, D., di Pietro, A., and Gillet, G. (2002). Interaction between the antiapoptotic protein Nr-13 and cytochrome c. Antagonistic effect of the BH3 domain of Bax. *Biochemistry* 41, 8540–8550.

Morcos, P.A. (2007). Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with Morpholino oligos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358, 521–527.

Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., and Fujii, S. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267, 1506–1510.

Murakoshi, H., Wang, H., and Yasuda, R. (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature* 472, 100–104.

- Murphy, A.N., Bredesen, D.E., Cortopassi, G., Wang, E., and Fiskum, G. (1996). Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 9893–9898.
- Murray, S.C., Flanagan, J., Popova, O.B., Chiu, W., Ludtke, S.J., and Serysheva, I.I. (2013). Validation of Cryo-EM Structure of IP3R1 Channel. *Structure* *21*, 900–909.
- Myers, D.C., Sepich, D.S., and Solnica-Krezel, L. (2002a). Bmp activity gradient regulates convergent extension during zebrafish gastrulation. *Dev Biol* *243*, 81–98.
- Myers, D.C., Sepich, D.S., and Solnica-Krezel, L. (2002b). Convergence and extension in vertebrate gastrulae: cell movements according to or in search of identity? *Trends Genet* *18*, 447–455.
- Nakade, S., Rhee, S.K., Hamanaka, H., and Mikoshiba, K. (1994). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of an immunoaffinity-purified homotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (type I) increases Ca²⁺ flux in reconstituted lipid vesicles. *J Biol Chem* *269*, 6735–6742.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* *403*, 98–103.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* *7*, 683–694.
- Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Sawa, H., and Loh, D.Y. (1994). Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 3700–3704.
- Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Shinkai, Y., Louie, M.C., Fields, L.E., Lucas, P.J., Stewart, V., and Alt, F.W. (1993). Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science* *261*, 1584–1588.
- Nakayama, T., Hattori, M., Uchida, K., Nakamura, T., Tateishi, Y., Bannai, H., Iwai, M., Michikawa, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2004). The regulatory domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is necessary to keep the channel domain closed: possible physiological significance of specific cleavage by caspase 3. *Biochem J* *377*, 299–307.
- Nasevicius, A., and Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nature Genetics* *26*, 216–220.
- Nishiyama, M., Hong, K., Mikoshiba, K., Poo, M.M., and Kato, K. (2000). Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* *408*, 584–588.
- Nosyreva, E., Miyakawa, T., Wang, Z., Glouchankova, L., Mizushima, A., Iino, M., and Bezprozvanny, I. (2002). The high-affinity calcium[Ca^{2+}]calmodulin-binding site does not play a role in the modulation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function by calcium and calmodulin. *Biochem J* *365*, 659–667.

Nutt, L.K., Chandra, J., Pataer, A., Fang, B., Roth, J.A., Swisher, S.G., O'Neil, R.G., and McConkey, D.J. (2002a). Bax-mediated Ca^{2+} mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. *J Biol Chem* 277, 20301–20308.

Nutt, L.K., Pataer, A., Pahler, J., Fang, B., Roth, J., McConkey, D.J., and Swisher, S.G. (2002b). Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca^{2+} stores. *J Biol Chem* 277, 9219–9225.

O'Boyle, S., Bree, R.T., McLoughlin, S., Greal, M., and Byrnes, L. (2007). Identification of zygotic genes expressed at the midblastula transition in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 462–468.

O'Reilly, L.A., Print, C., Hausmann, G., Moriishi, K., Cory, S., Huang, D.C., and Strasser, A. (2001). Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. *Cell Death Differ* 8, 486–494.

Oakes, S.A., Scorrano, L., Opferman, J.T., Bassik, M.C., Nishino, M., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2005). Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 105–110.

Oates, A.C., Bruce, A.E., and Ho, R.K. (2000). Too much interference: injection of double-stranded RNA has nonspecific effects in the zebrafish embryo. *Developmental Biology* 224, 20–28.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053–1058.

Oh, Y.J., Swarzenski, B.C., and O'Malley, K.L. (1996). Overexpression of Bcl-2 in a murine dopaminergic neuronal cell line leads to neurite outgrowth. *Neurosci Lett* 202, 161–164.

Olivier, N., Luengo-Oroz, M.A., Duloquin, L., Faure, E., Savy, T., Veilleux, I., Solinas, X., Débarre, D., Bourguin, P., Santos, A., et al. (2010). Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy. *Science* 329, 967–971.

Oltvai, Z.N., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609–619.

Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426, 671–676.

Otsu, H., Yamamoto, A., Maeda, N., Mikoshiba, K., and Tashiro, Y. (1990). Immunogold localization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate (InsP₃) receptor in mouse cerebellar Purkinje cells using three monoclonal antibodies. *Cell Struct Funct* 15, 163–173.

Ozawa, E., and Ebashi, S. (1967). Requirement of Ca^{2+} ion for the stimulating effect of cyclic 3',5'-AMP on muscle phosphorylase b kinase. *J Biochem* 62, 285–286.

- Palty, R., Silverman, W.F., Hershfinkel, M., Caporale, T., Sensi, S.L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., et al. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 436–441.
- Pan, Z., Bhat, M.B., Nieminen, A.L., and Ma, J. (2001). Synergistic movements of Ca(2+) and Bax in cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem* *276*, 32257–32263.
- Pantazaka, E., and Taylor, C.W. (2010). Targeting of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to the endoplasmic reticulum by its first transmembrane domain. *Biochem J* *425*, 61–69.
- Parys, J.B., Missiaen, L., De Smedt, H., and Casteels, R. (1993). Loading dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release in the clonal cell line A7r5. Implications for the mechanism of quantal Ca²⁺ release. *J Biol Chem* *268*, 25206–25212.
- Patel, S., Joseph, S.K., and Thomas, a P. (1999). Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* *25*, 247–264.
- Patel, S., Morris, S.A., Adkins, C.E., O’Beirne, G., and Taylor, C.W. (1997). Ca²⁺-independent inhibition of inositol trisphosphate receptors by calmodulin: redistribution of calmodulin as a possible means of regulating Ca²⁺ mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11627–11632.
- Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Barrow, R.K., and Snyder, S.H. (2004). RACK1 binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and mediates Ca²⁺ release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2328–2332.
- Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Kaplin, A.I., Barrow, R.K., and Snyder, S.H. (2005). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/GAPDH complex augments Ca²⁺ release via locally derived NADH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1357–1359.
- Pathan, N., Aime-Sempe, C., Kitada, S., Basu, A., Haldar, S., and Reed, J.C. (2001). Microtubule-targeting drugs induce bcl-2 phosphorylation and association with Pin1. *Neoplasia* *3*, 550–559.
- Pawlikowska, P., Leray, I., de Laval, B., Guihard, S., Kumar, R., Rosselli, F., and Porteu, F. (2010). ATM-dependent expression of IEX-1 controls nuclear accumulation of Mcl-1 and the DNA damage response. *Cell Death Differ* *17*, 1739–1750.
- Perciavalle, R.M., Stewart, D.P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M.M., Pelletier, S., Schuetz, J.D., et al. (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat Cell Biol* *14*, 575–583.
- Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., and Di Lisa, F. (1999). Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* *76*, 725–734.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T., and Fesik, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* *1644*, 83–94.

- Pinton, P., Ferrari, D., Magalhães, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (2000). Reduced Loading of Intracellular Ca²⁺ Stores and Downregulation of Capacitative Ca²⁺Influx in Bcl-2–Overexpressing Cells. *J Cell Biol* 148, 857–862.
- Poirier, S.N., Poitras, M., Chorvatova, A., Payet, M.D., and Guillemette, G. (2001). FK506 blocks intracellular Ca²⁺ oscillations in bovine adrenal glomerulosa cells. *Biochemistry* 40, 6486–6492.
- Pop, C., and Salvesen, G.S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 284, 21777–21781.
- Prentki, M., Biden, T.J., Janjic, D., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Wollheim, C.B. (1984). Rapid mobilization of Ca²⁺ from rat insulinoma microsomes by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 309, 562–564.
- Prentki, M., Corkey, B.E., and Matschinsky, F.M. (1985). Inositol 1,4,5-trisphosphate and the endoplasmic reticulum Ca²⁺ cycle of a rat insulinoma cell line. *J Biol Chem* 260, 9185–9190.
- Prince, W.T., Berridge, M.J., and Rasmussen, H. (1972). Role of calcium and adenosine-3':5'-cyclic monophosphate in controlling fly salivary gland secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 553–557.
- Print, C.G., Loveland, K.L., Gibson, L., Meehan, T., Stylianou, A., Wreford, N., de Kretser, D., Metcalf, D., Köntgen, F., Adams, J.M., et al. (1998). Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12424–12431.
- Putcha, G. V, Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., LaMarche, A., Maroney, A.C., et al. (2003). JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 38, 899–914.
- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3, 287–296.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., and Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293, 1829–1832.
- Qian, S., Wang, W., Yang, L., and Huang, H.W. (2008). Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: evidence for lipidic pores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17379–17383.
- Ramos-Franco, J., Galvan, D., Mignery, G.A., and Fill, M. (1999). Location of the Permeation Pathway in the Recombinant Type 1 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *J Gen Physiol* 114, 243–250.

- Ranger, A.M., Grusby, M.J., Hodge, M.R., Gravallesse, E.M., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Mickanin, C., Baldwin, H.S., and Glimcher, L.H. (1998). The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392, 186–190.
- Rapizzi, E., Pinton, P., Szabadkai, G., Wieckowski, M.R., Vandecasteele, G., Baird, G., Tuft, R.A., Fogarty, K.E., and Rizzuto, R. (2002). Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* 159, 613–624.
- Rasmussen, H. (1970). Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. *Science* 170, 404–412.
- Rasola, A., and Bernardi, P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12, 815–833.
- Rasola, A., and Bernardi, P. (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 50, 222–233.
- Rathmell, J.C., and Thompson, C.B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109 Suppl, S97–107.
- Rautureau, G.J.P., Yabal, M., Yang, H., Huang, D.C.S., Kvansakul, M., and Hinds, M.G. (2012). The restricted binding repertoire of Bcl-B leaves Bim as the universal BH3-only prosurvival Bcl-2 protein antagonist. *Cell Death Dis* 3, e443.
- Reed, J.C., Zha, H., Aime-Sempe, C., Takayama, S., and Wang, H.G. (1996). Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv Exp Med Biol* 406, 99–112.
- Regimbald-Dumas, Y., Arguin, G., Fregeau, M.-O., and Guillemette, G. (2007). cAMP-dependent protein kinase enhances inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release in AR4-2J cells. *J Cell Biochem* 101, 609–618.
- Reilly, L.A.O., Huang, D.C.S., and Strasser, A. (1996). The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J* 15, 6979–6990.
- Reinhard, E., Yokoe, H., Niebling, K.R., Allbritton, N.L., Kuhn, M.A., and Meyer, T. (1995). Localized calcium signals in early zebrafish development. *Dev Biol* 170, 50–61.
- Ren, D., Tu, H.-C., Kim, H., Wang, G.X., Bean, G.R., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* 330, 1390–1393.
- Renton, J.P., Xu, N., Clark, J.J., and Hansen, M.R. (2010). Interaction of neurotrophin signaling with Bcl-2 localized to the mitochondria and endoplasmic reticulum on spiral ganglion neuron survival and neurite growth. *J Neurosci Res* 88, 2239–2251.
- Rinkenberger, J., and Horning, S. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev* 14, 23–27.

- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262, 744–747.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., et al. (2009). Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta* 1787, 1342–1351.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science* 280, 1763–1766.
- Robb-Gaspers, L.D., Burnett, P., Rutter, G.A., Denton, R.M., Rizzuto, R., and Thomas, A.P. (1998). Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *EMBO J* 17, 4987–5000.
- Robu, M.E., Larson, J.D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S.A., and Ekker, S.C. (2007). p53 Activation by Knockdown Technologies. *PLoS Genetics* 3, 15.
- Rolland, S.G., Lu, Y., David, C.N., and Conradt, B. (2009). The BCL-2-like protein CED-9 of *C. elegans* promotes FZO-1/Mfn1,2- and EAT-3/Opa1-dependent mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 186, 525–540.
- Rondi-Reig, L., Lemaigre Dubreuil, Y., Martinou, J.C., Delhay-Bouchaud, N., Caston, J., and Mariani, J. (1997). Fear decrease in transgenic mice overexpressing bcl-2 in neurons. *Neuroreport* 8, 2429–2432.
- Rong, Y.-P., Aromolaran, A.S., Bultynck, G., Zhong, F., Li, X., McColl, K., Matsuyama, S., Herlitze, S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., et al. (2008). Targeting Bcl-2- IP_3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. *Mol Cell* 31, 255–265.
- Rong, Y.-P., Bultynck, G., Aromolaran, A.S., Zhong, F., Parys, J.B., De Smedt, H., Mignery, G.A., Roderick, H.L., Bootman, M.D., and Distelhorst, C.W. (2009). The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP_3 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14397–14402.
- Rostovtseva, T.K., Antonsson, B., Suzuki, M., Youle, R.J., Colombini, M., and Bezrukov, S.M. (2004). Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J Biol Chem* 279, 13575–13583.
- Roy, S.S., Ehrlich, A.M., Craigen, W.J., and Hajnóczky, G. (2009a). VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO Rep* 10, 1–7.
- Roy, S.S., Madesh, M., Davies, E., Antonsson, B., Danial, N., and Hajnóczky, G. (2009b). Bad targets the permeability transition pore independent of Bax or Bak to switch between Ca^{2+} -dependent cell survival and death. *Mol Cell* 33, 377–388.
- Ruvolo, P.P., Deng, X., Carr, B.K., and May, W.S. (1998). A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 273, 25436–25442.

Ruvolo, P.P., Deng, X., Ito, T., Carr, B.K., and May, W.S. (1999). Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem* 274, 20296–20300.

Sakamaki, J., Daitoku, H., Ueno, K., Hagiwara, A., Yamagata, K., and Fukamizu, A. (2011). Arginine methylation of BCL-2 antagonist of cell death (BAD) counteracts its phosphorylation and inactivation by Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 6085–6090.

Sander, J.D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R.T., Joung, J.K., and Yeh, J.-R.J. (2011). Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol* 29, 697–698.

Sato, C., Hamada, K., Ogura, T., Miyazawa, A., Iwasaki, K., Hiroaki, Y., Tani, K., Terauchi, A., Fujiyoshi, Y., and Mikoshiba, K. (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor Contains Multiple Cavities and L-shaped Ligand-binding Domains. *Journal of Molecular Biology* 336, 155–164.

Satoh, T., Ross, C.A., Villa, A., Supattapone, S., Pozzan, T., Snyder, S.H., and Meldolesi, J. (1990). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in cerebellar Purkinje cells: quantitative immunogold labeling reveals concentration in an ER subcompartment. *J Cell Biol* 111, 615–624.

Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., et al. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983–986.

Schafer, B., Quispe, J., Choudhary, V., Chipuk, J.E., Ajero, T.G., Du, H., Schneider, R., and Kuwana, T. (2009). Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation. *Mol Biol Cell* 20, 2276–2285.

Schellenberg, B., Wang, P., Keeble, J.A., Rodriguez-Enriquez, R., Walker, S., Owens, T.W., Foster, F., Tanianis-Hughes, J., Brennan, K., Streuli, C.H., et al. (2013). Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol Cell* 49, 959–971.

Schepis, A., Sepich, D., and Nelson, W.J. (2012). α E-catenin regulates cell-cell adhesion and membrane blebbing during zebrafish epiboly. *Development* 139, 537–546.

Schlesinger, P.H., Gross, A., Yin, X.M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11357–11362.

Schneider, I., Houston, D.W., Rebagliati, M.R., and Slusarski, D.C. (2008). Calcium fluxes in dorsal forerunner cells antagonize beta-catenin and alter left-right patterning. *Development* 135, 75–84.

Schug, Z.T., da Fonseca, P.C. a, Bhanumathy, C.D., Wagner, L., Zhang, X., Bailey, B., Morris, E.P., Yule, D.I., and Joseph, S.K. (2008). Molecular characterization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor pore-forming segment. *J Biol Chem* 283, 2939–2948.

Schug, Z.T., and Joseph, S.K. (2006). The role of the S4-S5 linker and C-terminal tail in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function. *J Biol Chem* 281, 24431–24440.

Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135–139.

Seo, M.-D., Velamakanni, S., Ishiyama, N., Stathopoulos, P.B., Rossi, A.M., Khan, S.A., Dale, P., Li, C., Ames, J.B., Ikura, M., et al. (2012). Structural and functional conservation of key domains in InsP3 and ryanodine receptors. *Nature* 487, 108–112.

Sepich, D.S., Calmelet, C., Kiskowski, M., and Solnica-Krezel, L. (2005). Initiation of convergence and extension movements of lateral mesoderm during zebrafish gastrulation. *Dev Dyn* 234, 279–292.

Sepich, D.S., Usmani, M., Pawlicki, S., and Solnica-Krezel, L. (2011). Wnt/PCP signaling controls intracellular position of MTOCs during gastrulation convergence and extension movements. *Development* 138, 543–552.

Serysheva, I.I., Bare, D.J., Ludtke, S.J., Kettlun, C.S., Chiu, W., and Mignery, G. a (2003). Structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor revealed by electron cryomicroscopy. *J Biol Chem* 278, 21319–21322.

Shah, P.K., and Sowdhamini, R. (2001). Structural understanding of the transmembrane domains of inositol triphosphate receptors and ryanodine receptors towards calcium channeling. *Protein Eng* 14, 867–874.

Sheldahl, L.C., Slusarski, D.C., Pandur, P., Miller, J.R., Köhl, M., and Moon, R.T. (2003). Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol* 161, 769–777.

Shibasaki, F., Kondo, E., Akagi, T., and McKeon, F. (1997). Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature* 386, 728–731.

Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., and Tsujimoto, Y. (2000). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3100–3105.

Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487.

Shimizu, T., Yabe, T., Muraoka, O., Yonemura, S., Aramaki, S., Hatta, K., Bae, Y.-K., Nojima, H., and Hibi, M. (2005). E-cadherin is required for gastrulation cell movements in zebrafish. *Mech Dev* 122, 747–763.

Shinohara, T., Michikawa, T., Enomoto, M., Goto, J., Iwai, M., Matsu-ura, T., Yamazaki, H., Miyamoto, A., Suzuki, A., and Mikoshiba, K. (2011). Mechanistic basis of bell-shaped dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gating on cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 15486–15491.

Shirane, M., and Nakayama, K.I. (2003). Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 28–37.

Shore, G.C., and Tata, J.R. (1977). Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. II. Cytoplasmic messenger RNA's which code for albumin and mitochondrial proteins are distributed differently between the two fractions. *J Cell Biol* 72, 726–743.

Shoshan-Barmatz, V., and Gincel, D. (2003). The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys* 39, 279–292.

Siddiqui, M., Sheikh, H., Tran, C., and Bruce, A.E.E. (2010). The tight junction component Claudin E is required for zebrafish epiboly. *Dev Dyn* 239, 715–722.

Sienaert, I., Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J.B., Sipma, H., and Casteels, R. (1997). Molecular and functional evidence for multiple Ca^{2+} -binding domains in the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 272, 25899–25906.

Sienaert, I., Nadif Kasri, N., Vanlingen, S., Parys, J.B., Callewaert, G., Missiaen, L., and de Smedt, H. (2002). Localization and function of a calmodulin-apocalmodulin-binding domain in the N-terminal part of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J* 365, 269–277.

Sienaert, I., De Smedt, H., Parys, J.B., Missiaen, L., Vanlingen, S., Sipma, H., and Casteels, R. (1996). Characterization of a cytosolic and a luminal Ca^{2+} binding site in the type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 271, 27005–27012.

Simmen, T., Aslan, J.E., Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S.F., Hung, C.-H., Crump, C.M., and Thomas, G. (2005). PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J* 24, 717–729.

Sipma, H., De Smet, P., Sienaert, I., Vanlingen, S., Missiaen, L., Parys, J.B., and De Smedt, H. (1999). Modulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Binding to the Recombinant Ligand-binding Site of the Type-1 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor by Ca^{2+} and Calmodulin. *J Biol Chem* 274, 12157–12162.

Skromne, I., and Prince, V.E. (2008). Current perspectives in zebrafish reverse genetics: moving forward. *Dev Dyn* 237, 861–882.

Slanchev, K., Carney, T.J., Stemmler, M.P., Koschorz, B., Amsterdam, A., Schwarz, H., and Hammerschmidt, M. (2009). The epithelial cell adhesion molecule EpCAM is required for epithelial morphogenesis and integrity during zebrafish epiboly and skin development. *PLoS Genet* 5, e1000563.

Slusarski, D.C., Corces, V.G., and Moon, R.T. (1997a). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410–413.

Slusarski, D.C., Yang-Snyder, J., Busa, W.B., and Moon, R.T. (1997b). Modulation of embryonic intracellular Ca^{2+} signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* 182, 114–120.

Solnica-Krezel, L. (2006). Gastrulation in zebrafish -- all just about adhesion? *Curr Opin Genet Dev* 16, 433–441.

Solnica-Krezel, L., and Driever, W. (1994). Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organization and function during epiboly. *Development* 120, 2443–2455.

Song, Q., Kuang, Y., Dixit, V.M., and Vincenz, C. (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J* 18, 167–178.

Soulsby, M., and Wojcikiewicz, R.J.H. (2005). The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase at three sites. *Biochem J* 392, 493–497.

Soulsby, M.D., and Wojcikiewicz, R.J.H. (2007). Calcium mobilization via type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors is not altered by PKA-mediated phosphorylation of serines 916, 934, and 1832. *Cell Calcium* 42, 261–270.

Spät, A., Bradford, P.G., McKinney, J.S., Rubin, R.P., and Putney, J.W. (1986). A saturable receptor for 32P-inositol-1,4,5-triphosphate in hepatocytes and neutrophils. *Nature* 319, 514–516.

Srinivasula, S.M., and Ashwell, J.D. (2008). IAPs: what's in a name? *Mol Cell* 30, 123–135.

Srivastava, R.K., Mi, Q.S., Hardwick, J.M., and Longo, D.L. (1999). Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3775–3780.

Srivastava, R.K., Srivastava, A.R., Korsmeyer, S.J., Nesterova, M., Cho-Chung, Y.S., and Longo, D.L. (1998). Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 18, 3509–3517.

Strähle, U., and Jesuthasan, S. (1993). Ultraviolet irradiation impairs epiboly in zebrafish embryos: evidence for a microtubule-dependent mechanism of epiboly. *Development* 119, 909–919.

Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5, 189–200.

Straub, S. V, Giovannucci, D.R., Bruce, J.I.E., and Yule, D.I. (2002). A Role for Phosphorylation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors in Defining Calcium Signals Induced by Peptide Agonists in Pancreatic Acinar Cells. *Journal of Biological Chemistry* 277, 31949–31956.

Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Schulz, I. (1983). Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306, 67–69.

Südhof, T.C., Newton, C.L., Archer, B.T., Ushkaryov, Y.A., and Mignery, G.A. (1991). Structure of a novel InsP3 receptor. *EMBO J* 10, 3199–3206.

- Sugawara, H., Kurosaki, M., Takata, M., and Kurosaki, T. (1997). Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J* 16, 3078–3088.
- Sugiyama, T., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. (2002). Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene* 21, 4944–4956.
- Sun, L., Haun, S., Jones, R.C., Edmondson, R.D., and Machaca, K. (2009). Kinase-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca^{2+} release during oocyte maturation. *J. Biol. Chem.* 284, 20184–20196.
- Sun, Y., Rossi, A.M., Rahman, T., and Taylor, C.W. (2013). Activation of IP3 receptors requires an endogenous 1-8-14 calmodulin-binding motif. *Biochem J* 449, 39–49.
- Sureshan, K.M., Riley, A.M., Rossi, A.M., Tovey, S.C., Dedos, S.G., Taylor, C.W., and Potter, B.V.L. (2009). Activation of IP(3) receptors by synthetic bisphosphate ligands. *Chem Commun (Camb)* 3, 1204–1206.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441–446.
- Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645–654.
- Swatton, J.E., and Taylor, C.W. (2002). Fast biphasic regulation of type 3 inositol trisphosphate receptors by cytosolic calcium. *J Biol Chem* 277, 17571–17579.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca^{2+} channels. *J Cell Biol* 175, 901–911.
- Szabo, T., Vanderheyden, V., Parys, J.B., De Smedt, H., Rietdorf, K., Kotelevets, L., Chastre, E., Khan, F., Landegren, U., Söderberg, O., et al. (2008). Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca^{2+} release and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2427–2432.
- Szalai, G., Krishnamurthy, R., and Hajnóczky, G. (1999). Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J* 18, 6349–6361.
- Takei, K., Shin, R.M., Inoue, T., Kato, K., and Mikoshiba, K. (1998). Regulation of nerve growth mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in growth cones. *Science* 282, 1705–1708.
- Tamura, Y., Shimizu, S., and Osada, H. (2004). The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria. *FEBS Lett* 569, 249–255.

- Tan, F.J., Husain, M., Manlandro, C.M., Koppenol, M., Fire, A.Z., and Hill, R.B. (2008). CED-9 and mitochondrial homeostasis in *C. elegans* muscle. *J Cell Sci* 121, 3373–3382.
- Tan, W., and Colombini, M. (2007). VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim Biophys Acta* 1768, 2510–2515.
- Tan, Y., Demeter, M.R., Ruan, H., and Comb, M.J. (2000). BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival. *J Biol Chem* 275, 25865–25869.
- Tan, Y., Dourdin, N., Wu, C., De Veyra, T., Elce, J.S., and Greer, P.A. (2006). Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281, 16016–16024.
- Tan, Y., Ruan, H., Demeter, M.R., and Comb, M.J. (1999). p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 274, 34859–34867.
- Tang, T.-S., Tu, H., Chan, E.Y.W., Maximov, A., Wang, Z., Wellington, C.L., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. (2003a). Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* 39, 227–239.
- Tang, T.-S., Tu, H., Wang, Z., and Bezprozvanny, I. (2003b). Modulation of type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor function by protein kinase a and protein phosphatase 1alpha. *J Neurosci* 23, 403–415.
- Tang, T.-S., Tu, H., Orban, P.C., Chan, E.Y.W., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. (2004). HAP1 facilitates effects of mutant huntingtin on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in primary culture of striatal medium spiny neurons. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1779–1787.
- Tanimura, A., and Turner, R.J. (1996). Calcium release in HSY cells conforms to a steady-state mechanism involving regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca²⁺ channel by luminal [Ca²⁺]. *J Cell Biol* 132, 607–616.
- Taylor, C.W., and Tovey, S.C. (2010). IP(3) receptors: toward understanding their activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a004010.
- Terrano, D.T., Upreti, M., and Chambers, T.C. (2009). Cyclin-Dependent Kinase 1-Mediated Bcl-xL/Bcl-2 Phosphorylation Acts as a Functional Link Coupling Mitotic Arrest and Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 30, 640–656.
- Thisse, B., Heyer, V., Lux, A., Alunni, V., Degrave, A., Seiliez, I., Kirchner, J., Parkhill, J.-P., and Thisse, C. (2004). Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening. *Methods Cell Biol* 77, 505–519.
- Thomas, L.W., Lam, C., Clark, R.E., White, M.R.H., Spiller, D.G., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2012). Serine 162, an essential residue for the mitochondrial localization, stability and anti-apoptotic function of mcl-1. *PLoS One* 7, e45088.

Thrower, E.C., Mobasheri, H., Dargan, S., Marius, P., Lea, E.J., and Dawson, A.P. (2000). Interaction of luminal calcium and cytosolic ATP in the control of type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor channels. *J Biol Chem* 275, 36049–36055.

Thrower, E.C., Park, H.Y., So, S.H., Yoo, S.H., and Ehrlich, B.E. (2002). Activation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by the calcium storage protein chromogranin A. *J. Biol. Chem.* 277, 15801–15806.

Thrower, E.C., Choe, C.U., So, S.H., Jeon, S.H., Ehrlich, B.E., and Yoo, S.H. (2003). A functional interaction between chromogranin B and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 278, 49699–49706.

Tovey, S.C., Dedos, S.G., Rahman, T., Taylor, E.J.A., Pantazaka, E., and Taylor, C.W. (2010). Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors by cAMP Independent of cAMP-dependent Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 285, 12979–12989.

Tran, V.H., Bartolo, R., Westphal, D., Alsop, A., Dewson, G., and Kluck, R.M. (2013). Bak apoptotic function is not directly regulated by phosphorylation. *Cell Death Dis* 4, e452.

Trinkaus, J.P. (1951). A study of the mechanism of epiboly in the egg of *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Zoology* 118, 269–319.

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440–1443.

Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.-F., Hao, Y.-H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G., and Bezprozvanny, I. (2006). Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* 126, 981–993.

Tu, H., Nosyreva, E., Miyakawa, T., Wang, Z., Mizushima, A., Iino, M., and Bezprozvanny, I. (2003). Functional and biochemical analysis of the type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor calcium sensor. *Biophys J* 85, 290–299.

Tu, H., Tang, T.-S., Wang, Z., and Bezprozvanny, I. (2004). Association of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor with AKAP9 (Yotiao) and protein kinase A. *J Biol Chem* 279, 19375–19382.

Tu, J.C., Xiao, B., Yuan, J.P., Lanahan, A.A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D.J., and Worley, P.F. (1998). Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron* 21, 717–726.

Uchida, K., Aramaki, M., Nakazawa, M., Yamagishi, C., Makino, S., Fukuda, K., Nakamura, T., Takahashi, T., Mikoshiba, K., and Yamagishi, H. (2010). Gene knock-outs of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors types 1 and 2 result in perturbation of cardiogenesis. *PLoS One* 5, 10.

Uchida, K., Miyauchi, H., Furuichi, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2003). Critical regions for activation gating of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 278, 16551–16560.

Uemura, T., Green, M., Corson, T.W., Perova, T., Li, P.P., and Warsh, J.J. (2011). Bcl-2 SNP rs956572 associates with disrupted intracellular calcium homeostasis in bipolar I disorder. *Bipolar Disord* 13, 41–51.

Ulrich, F., Krieg, M., Schötz, E.-M., Link, V., Castanon, I., Schnabel, V., Taubenberger, A., Mueller, D., Puech, P.-H., and Heisenberg, C.-P. (2005). Wnt11 functions in gastrulation by controlling cell cohesion through Rab5c and E-cadherin. *Dev Cell* 9, 555–564.

Upreti, M., Galitovskaya, E.N., Chu, R., Tackett, A.J., Terrano, D.T., Granell, S., and Chambers, T.C. (2008). Identification of the major phosphorylation site in Bcl-xL induced by microtubule inhibitors and analysis of its functional significance. *J Biol Chem* 283, 35517–35525.

Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S., and Gregory, P.D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics* 11, 636–646.

Urtishak, K.A., Choob, M., Tian, X., Sternheim, N., Talbot, W.S., Wickstrom, E., and Farber, S.A. (2003). Targeted gene knockdown in zebrafish using negatively charged peptide nucleic acid mimics. *Developmental Dynamics an Official Publication of the American Association of Anatomists* 228, 405–413.

Urven, L.E., Yabe, T., and Pelegri, F. (2006). A role for non-muscle myosin II function in furrow maturation in the early zebrafish embryo. *J Cell Sci* 119, 4342–4352.

Uysal, S., Vasquez, V., Tereshko, V., Esaki, K., Fellouse, F.A., Sidhu, S.S., Koide, S., Perozo, E., and Kossiakoff, A. (2009). Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 6644–6649.

Vais, H., Foskett, J.K., Ullah, G., Pearson, J.E., and Daniel Mak, D.-O. (2012). Permeant calcium ion feed-through regulation of single inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel gating. *J Gen Physiol* 140, 697–716.

Valero, J.G., Cornut-Thibaut, A., Jugé, R., Debaud, A.-L., Giménez, D., Gillet, G., Bonnefoy-Bérard, N., Salgado, J., Salles, G., Aouacheria, A., et al. (2012). μ -Calpain conversion of antiapoptotic Bfl-1 (BCL2A1) into a prodeath factor reveals two distinct alpha-helices inducing mitochondria-mediated apoptosis. *PLoS One* 7, e38620.

Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem* 265, 7248–7256.

Van Coppenolle, F., Vanden Abeele, F., Slomianny, C., Flourakis, M., Hesketh, J., Dewailly, E., and Prevarskaya, N. (2004). Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci* 117, 4135–4142.

Vanden Abeele, F., Skryma, R., Shuba, Y., Van Coppenolle, F., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Mauroy, B., Wuytack, F., and Prevarskaya, N. (2002). Bcl-2-dependent modulation of Ca^{2+} homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 1, 169–179.

- Vander Heiden, M.G., Li, X.X., Gottlieb, E., Hill, R.B., Thompson, C.B., and Colombini, M. (2001). Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 276, 19414–19419.
- Vanderheyden, V., Wakai, T., Bultynck, G., De Smedt, H., Parys, J.B., and Fissore, R.A. (2009). Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 function during oocyte maturation by MPM-2 phosphorylation. *Cell Calcium* 46, 56–64.
- Vannier, C., Mock, K., Brabletz, T., and Driever, W. (2013). Zeb1 regulates E-cadherin and Epcam expression to control cell behavior in early zebrafish development. *J Biol Chem*.
- Van Rossum, D.B., Patterson, R.L., Cheung, K.-H., Barrow, R.K., Syrovatkina, V., Gessell, G.S., Burkholder, S.G., Watkins, D.N., Foskett, J.K., and Snyder, S.H. (2006). DANGER, a novel regulatory protein of inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor activity. *J. Biol. Chem.* 281, 37111–37116.
- Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440–442.
- Vaux, D.L., Weissman, I.L., and Kim, S.K. (1992). Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258, 1955–1957.
- Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229–240.
- Verbert, L., Lee, B., Kocks, S.L., Assefa, Z., Parys, J.B., Missiaen, L., Callewaert, G., Fissore, R. a, De Smedt, H., and Bultynck, G. (2008). Caspase-3-truncated type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor enhances intracellular Ca²⁺ leak and disturbs Ca²⁺ signalling. *Biol Cell* 100, 39–49.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43–53.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., et al. (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277, 445–454.
- Verma, S., Zhao, L.J., and Chinnadurai, G. (2001). Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem* 276, 4671–4676.
- Vermassen, E., Fissore, R.A., Nadif Kasri, N., Vanderheyden, V., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J.B., and De Smedt, H. (2004a). Regulation of the phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 888–893.

- Vermassen, E., Parys, J.B., and Mauger, J.-P. (2004b). Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biol Cell* 96, 3–17.
- Villunger, a, Labi, V., Bouillet, P., Adams, J., and Strasser, a (2011). Can the analysis of BH3-only protein knockout mice clarify the issue of “direct versus indirect” activation of Bax and Bak? *Cell Death Differ* 18, 1545–1546.
- Volpe, P., Salviati, G., Di Virgilio, F., and Pozzan, T. (1985). Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature* 316, 347–349.
- Von der Hardt, S., Bakkers, J., Inbal, A., Carvalho, L., Solnica-Krezel, L., Heisenberg, C.-P., and Hammerschmidt, M. (2007). The Bmp gradient of the zebrafish gastrula guides migrating lateral cells by regulating cell-cell adhesion. *Curr Biol* 17, 475–487.
- Wagner, D.S., Dosch, R., Mintzer, K.A., Wiemelt, A.P., and Mullins, M.C. (2004a). Maternal control of development at the midblastula transition and beyond: mutants from the zebrafish II. *Dev Cell* 6, 781–790.
- Wagner, K.U., Claudio, E., Rucker, E.B., Riedlinger, G., Broussard, C., Schwartzberg, P.L., Siebenlist, U., and Hennighausen, L. (2000). Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development* 127, 4949–4958.
- Wagner, L.E., Betzenhauser, M.J., and Yule, D.I. (2006). ATP binding to a unique site in the type-1 S2- inositol 1,4,5-trisphosphate receptor defines susceptibility to phosphorylation by protein kinase A. *J Biol Chem* 281, 17410–17419.
- Wagner, L.E., Joseph, S.K., and Yule, D.I. (2008). Regulation of single inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel activity by protein kinase A phosphorylation. *J Physiol* 586, 3577–3596.
- Wagner, L.E., Li, W.-H., Joseph, S.K., and Yule, D.I. (2004b). Functional consequences of phosphomimetic mutations at key cAMP-dependent protein kinase phosphorylation sites in the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 279, 46242–46252.
- Wagner, L.E., Li, W.-H., and Yule, D.I. (2003). Phosphorylation of type-1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cyclic nucleotide-dependent protein kinases: a mutational analysis of the functionally important sites in the S2+ and S2- splice variants. *J Biol Chem* 278, 45811–45817.
- Wallingford, J.B., Fraser, S.E., and Harland, R.M. (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell* 2, 695–706.
- Waltereit, R., and Weller, M. (2003). Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 27, 99–106.

- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., and Reed, J.C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339–343.
- Wang, J., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2011). Bcl-xL phosphorylation at Ser49 by polo kinase 3 during cell cycle progression and checkpoints. *Cell Signal* 23, 2030–2038.
- Wang, J., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2012). Phospho-Bcl-x(L)(Ser62) plays a key role at DNA damage-induced G(2) checkpoint. *Cell Cycle* 11, 2159–2169.
- Wang, X., Belguise, K., Kersual, N., Kirsch, K.H., Mineva, N.D., Galtier, F., Chalbos, D., and Sonenshein, G.E. (2007). Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat Cell Biol* 9, 470–478.
- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., and Xue, D. (2002). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298, 1587–1592.
- Wang, Z., Song, W., Aboukameel, A., Mohammad, M., Wang, G., Banerjee, S., Kong, D., Wang, S., Sarkar, F.H., and Mohammad, R.M. (2008). TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, inhibits cell growth and invasion in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 123, 958–966.
- Warga, R.M., and Kimmel, C.B. (1990). Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development* 108, 569–580.
- Webb, S.E., Lee, K.W., Karplus, E., and Miller, A.L. (1997). Localized calcium transients accompany furrow positioning, propagation, and deepening during the early cleavage period of zebrafish embryos. *Dev Biol* 192, 78–92.
- Webb, S.E., and Miller, A.L. (2000). Calcium signalling during zebrafish embryonic development. *Bioessays* 22, 113–123.
- Webb, S.E., and Miller, A.L. (2003). Imaging intercellular calcium waves during late epiboly in intact zebrafish embryos. *Zygote* 11, 175–182.
- Webb, S.E., and Miller, A.L. (2006). Ca²⁺ signaling and early embryonic patterning during the blastula and gastrula periods of zebrafish and *Xenopus* development. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1192–1208.
- Webb, S.E., Moreau, M., Leclerc, C., and Miller, A.L. (2005). Calcium transients and neural induction in vertebrates. *Cell Calcium* 37, 375–385.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14, 2060–2071.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, a J., Roth, K. a, MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727–730.

Welch, W., Rheault, S., West, D.J., and Williams, A.J. (2004). A model of the putative pore region of the cardiac ryanodine receptor channel. *Biophys J* 87, 2335–2351.

Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 872–884.

Westfall, T. a, Hjertos, B., and Slusarski, D.C. (2003a). Requirement for intracellular calcium modulation in zebrafish dorsal–ventral patterning. *Developmental Biology* 259, 380–391.

Westfall, T.A., Brimeyer, R., Twedt, J., Gladon, J., Olberding, A., Furutani-Seiki, M., and Slusarski, D.C. (2003b). Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity. *J Cell Biol* 162, 889–898.

White, C., Li, C., Yang, J., Petrenko, N.B., Madesh, M., Thompson, C.B., and Foskett, J.K. (2005). The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-XL modulation of the InsP3R. *Nat Cell Biol* 7, 1021–1028.

White, C., Yang, J., Monteiro, M.J., and Foskett, J.K. (2006). CIB1, a ubiquitously expressed Ca²⁺-binding protein ligand of the InsP3 receptor Ca²⁺ release channel. *J. Biol. Chem.* 281, 20825–20833.

Wick, W., Wagner, S., Kerkau, S., Dichgans, J., Jörg, T.C., and Weller, M. (1998). BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett* 440, 419–424.

Wienholds, E., Van Eeden, F., Kusters, M., Mudde, J., Plasterk, R.H.A., and Cuppen, E. (2003). Efficient Target-Selected Mutagenesis in Zebrafish. *Genome Research* 13, 2700–2707.

Wilcox, R. a, Primrose, W.U., Nahorski, S.R., and Challiss, R. a (1998). New developments in the molecular pharmacology of the myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol Sci* 19, 467–475.

Wilkins, S.J., Yoong, S., Verkade, H., Mizoguchi, T., Plowman, S.J., Hancock, J.F., Kikuchi, Y., Heath, J.K., and Perkins, A.C. (2008). Mtx2 directs zebrafish morphogenetic movements during epiboly by regulating microfilament formation. *Dev Biol* 314, 12–22.

Williams, A.J., West, D.J., and Sitsapasan, R. (2001). Light at the end of the Ca(2+)-release channel tunnel: structures and mechanisms involved in ion translocation in ryanodine receptor channels. *Q Rev Biophys* 34, 61–104.

Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., et al. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856–859.

Winslow, M.M., Neilson, J.R., and Crabtree, G.R. (2003). Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 15, 299–307.

Wojcikiewicz, R.J., and Luo, S.G. (1998). Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cAMP-dependent protein kinase. Type I, II, and III receptors are differentially

susceptible to phosphorylation and are phosphorylated in intact cells. *J Biol Chem* 273, 5670–5677.

Wolter, K.G., Hsu, Y.-T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139, 1281–1292.

Xiao, A., Wang, Z., Hu, Y., Wu, Y., Luo, Z., Yang, Z., Zu, Y., Li, W., Huang, P., Tong, X., et al. (2013). Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res* 41, 1–11.

Xin, M., and Deng, X. (2006). Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *J Biol Chem* 281, 18859–18867.

Xin, M., Gao, F., May, W.S., Flagg, T., and Deng, X. (2007). Protein kinase C ζ abrogates the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *J Biol Chem* 282, 21268–21277.

Xu, X.-P., Zhai, D., Kim, E., Swift, M., Reed, J.C., Volkmann, N., and Hanein, D. (2013). Three-dimensional structure of Bax-mediated pores in membrane bilayers. *Cell Death and Disease* 4, e683.

Yakovlev, A.G., Di Giovanni, S., Wang, G., Liu, W., Stoica, B., and Faden, A.I. (2004). BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 279, 28367–28374.

Yamada, M., Miyawaki, A., Saito, K., Nakajima, T., Yamamoto-Hino, M., Ryo, Y., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1995). The calmodulin-binding domain in the mouse type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J* 308 (Pt 1), 83–88.

Yamamoto, H., Maeda, N., Niinobe, M., Miyamoto, E., and Mikoshiba, K. (1989). Phosphorylation of P400 protein by cyclic AMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurochem* 53, 917–923.

Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 Is Phosphorylated and Inactivated by an ASK1/Jun N-Terminal Protein Kinase Pathway Normally Activated at G2/M. *Mol Cell Biol* 19, 8469–8478.

Yamanaka, Y., Mizuno, T., Sasai, Y., Kishi, M., Takeda, H., Kim, C.H., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). A novel homeobox gene, dharma, can induce the organizer in a non-cell-autonomous manner. *Genes Dev* 12, 2345–2353.

Yamashita, S., Miyagi, C., Carmany-Rampey, A., Shimizu, T., Fujii, R., Schier, A.F., and Hirano, T. (2002). Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. *Dev Cell* 2, 363–375.

Yamazaki, H., Chan, J., Ikura, M., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2010). Tyr-167/Trp-168 in type 1/3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates functional coupling between ligand binding and channel opening. *J Biol Chem* 285, 36081–36091.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129–1132.

Yang, J., McBride, S., Mak, D.-O.D., Vardi, N., Palczewski, K., Haeseleer, F., and Foskett, J.K. (2002). Identification of a family of calcium sensors as protein ligands of inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7711–7716.

Yang, T., Kozopas, K.M., and Craig, R.W. (1995). The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol* 128, 1173–1184.

Yano, S., Tokumitsu, H., and Soderling, T.R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396, 584–587.

Yin, C., Ciruna, B., and Solnica-Krezel, L. (2009). Convergence and extension movements during vertebrate gastrulation. *Curr Top Dev Biol* 89, 163–192.

Yin, C., and Solnica-Krezel, L. (2007). Convergence and extension movements affect dynamic notochord-somite interactions essential for zebrafish slow muscle morphogenesis. *Dev Dyn* 236, 2742–2756.

Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886–891.

Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276, 13935–13940.

Yoshikawa, F., Iwasaki, H., Michikawa, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999a). Cooperative Formation of the Ligand-binding Site of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor by Two Separable Domains. *J Biol Chem* 274, 328–334.

Yoshikawa, F., Iwasaki, H., Michikawa, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999b). Trypsinized Cerebellar Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor. Structural and functional coupling of cleaved ligand binding and channel. *J Biol Chem* 274, 316–327.

Yoshikawa, F., Morita, M., Monkawa, T., Michikawa, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1996). Mutational Analysis of the Ligand Binding Site of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *J Biol Chem* 271, 18277–18284.

Yoo, S.H., and Lewis, M.S. (2000). Interaction of chromogranin B and the near N-terminal region of chromogranin B with an intraluminal loop peptide of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 30293–30300.

Yoo, S.H., So, S.H., Kweon, H.S., Lee, J.S., Kang, M.K., and Jeon, C.J. (2000). Coupling of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and chromogranins A and B in secretory granules. *J. Biol. Chem.* 275, 12553–12559.

Yuen, M.Y.F., Webb, S.E., Chan, C.M., Thisse, B., Thisse, C., and Miller, A.L. (2013). Characterization of Ca(2+) signaling in the external yolk syncytial layer during the late blastula and early gastrula periods of zebrafish development. *Biochim Biophys Acta* 1833, 1641–1656.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619–628.

Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J. (2000). Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 290, 1761–1765.

Zhang, H., Holzgreve, W., and De Geyter, C. (2001). Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Hum Mol Genet* 10, 2329–2339.

Zhang, J., Webb, S.E., Ma, L.H., Chan, C.M., and Miller, A.L. (2011). Necessary role for intracellular Ca²⁺ transients in initiating the apical-basolateral thinning of enveloping layer cells during the early blastula period of zebrafish development. *Dev Growth Differ* 53, 679–696.

Zhang, X., and Joseph, S.K. (2001). Effect of mutation of a calmodulin binding site on Ca²⁺ regulation of inositol trisphosphate receptors. *Biochem J* 360, 395–400.

Zhao, J., Xin, M., Wang, T., Zhang, Y., and Deng, X. (2009). Nicotine enhances the antiapoptotic function of Mcl-1 through phosphorylation. *Mol Cancer Res* 7, 1954–1961.

Zhao, M., Li, P., Li, X., Zhang, L., Winkfein, R.J., and Chen, S.R.W. (1999). Molecular Identification of the Ryanodine Receptor Pore-forming Segment. *J Biol Chem* 274, 25971–25974.

Zhao, Y., Altman, B.J., Coloff, J.L., Herman, C.E., Jacobs, S.R., Wieman, H.L., Wofford, J.A., Dimascio, L.N., Ilkayeva, O., Kelekar, A., et al. (2007). Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. *Mol Cell Biol* 27, 4328–4339.

Zhao, Z., Cao, Y., Li, M., and Meng, A. (2001). Double-stranded RNA injection produces nonspecific defects in zebrafish. *Developmental Biology* 229, 215–223.

Zhong, F., Harr, M.W., Bultynck, G., Monaco, G., Parys, J.B., De Smedt, H., Rong, Y.-P., Molitoris, J.K., Lam, M., Ryder, C., et al. (2011). Induction of Ca²⁺-driven apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by peptide-mediated disruption of Bcl-2-IP3 receptor interaction. *Blood* 117, 2924–2934.

Zhu, D.M., Tekle, E., Chock, P.B., and Huang, C.Y. (1996). Reversible phosphorylation as a controlling factor for sustaining calcium oscillations in HeLa cells: Involvement of calmodulin-dependent kinase II and a calyculin A-inhibitable phosphatase. *Biochemistry* 35, 7214–7223.

Zhu, L., Ling, S., Yu, X.D., Venkatesh, L.K., Subramanian, T., Chinnadurai, G., and Kuo, T.H. (1999). Modulation of mitochondrial Ca^{2+} homeostasis by Bcl-2. *J Biol Chem* 274, 33267–33273.

Zhu, L., Yu, Y., Chua, B.H., Ho, Y.S., and Kuo, T.H. (2001). Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 33, 2135–2144.

Zhu, S., Liu, L., Korzh, V., Gong, Z., and Low, B.C. (2006). RhoA acts downstream of Wnt5 and Wnt11 to regulate convergence and extension movements by involving effectors Rho kinase and Diaphanous: use of zebrafish as an in vivo model for GTPase signaling. *Cell Signal* 18, 359–372.

Zong, W.-X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.-C., Yuan, J., and Thompson, C.B. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 162, 59–69.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405–413.